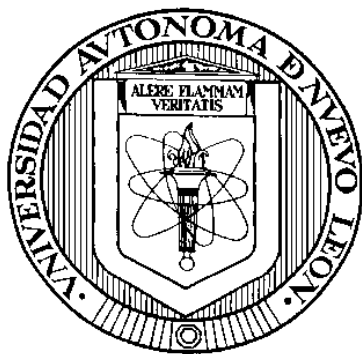


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO DE UNA FIBRA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA BASADA EN LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA EXTRACCIÓN
DE RESIDUOS DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y
DE CUIDADO PERSONAL**

Por:

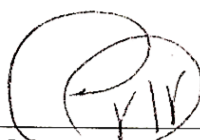
M. C. OMAR JASSIEL PORTILLO CASTILLO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
orientación en Química Biomédica**

JULIO DE 2020

**DESARROLLO DE UNA FIBRA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA BASADA EN LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA EXTRACCIÓN
DE RESIDUOS DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y
DE CUIDADO PERSONAL**

Aprobación de tesis:



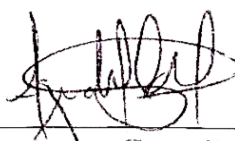
Dra. C. Marsela Garza Tapia
Director de tesis



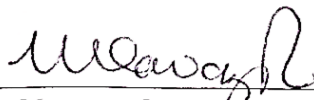
Dra. C. Rocío Castro Ríos
Co - Director de tesis



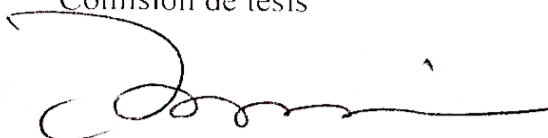
Dr. C. Abelardo Chávez Montes
Comisión de tesis



Dra. C. Azucena González Horta
Comisión de tesis



Dra. C. Norma Cavazos Rocha
Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de estudios de posgrado

DEDICATORIA

A la familia que pertenezco y a la familia que elegí, por siempre estar conmigo.

A los que no están físicamente a mi lado pero siempre están en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Dios:

Gracias por acompañarme, guiarme en cada paso que doy y permitirme vivir cada momento de mi vida.

A mis padres:

Quienes me han forjado como la persona que soy y porque son promotores de mis sueños; gracias por creer y confiar en mí, por su apoyo y amor incondicional.

Iván:

De verdad que tengo mucho que agradecerte, gracias por nunca dejarme solo, por tu apoyo, tus consejos y por ser un ejemplo de superación y motivación en todos los aspectos de mi vida.

A mis hermanos:

Porque son una fuente de inspiración y cariño hacia mi persona, gracias por su apoyo incondicional y por haberme permitido conocer a esos sobrinos preferidos que los quiero con todo mi corazón.

Directora de tesis:

Dra. Marsela, gracias por haberme permitido formar parte de tu proyecto, por apoyarme en el desarrollo y evolución de mi tesis.

Comisión de tesis:

Dra. Rocío, gracias por las revisiones y el apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

Dra. Norma, Dr. Abelardo y Dra. Azucena, gracias por todas las observaciones y consejos que permitieron el desarrollo adecuado de este proyecto.

Dra. Graciela, gracias por tu apoyo en el desarrollo de los diseños de experimentos.

Gorditos:

Sin sus salidas por las tostadas, papitas y cocas, esto no hubiese sido igual. Gracias por su apoyo, amistad, pláticas y cariño. Gracias, Ceci y Elda.

Compañeros de posgrado:

Por las pláticas, consejos y ayuda que siempre compartimos, gracias a todos.

Cuadro Chico: Yazmín, Aída, Barbara, gracias por aguantar y escuchar cada una de mis pláticas y una que otra privación, por tratar de comprender cada unas de las “curiosidades” que uno puede tener.

Marco y Gualberto, porque aunque vivimos circunstancias diferentes, se convirtieron en excelentes compañeros y amigos. Roberto, porque al escribir esto significa que yo también terminé, gracias por los tiempos compartidos en el laboratorio.

Juan (Green), porque aunque tus raíces francésas te reclamen, siempre estuviste al pendiente de lo que pasaba en el cubi.

A cada uno de los compañeros estudiantes que pasaron por el cubículo tratando de conquistar el mundo de la investigación: Héctor (Pokemón), Yolanda, Dinora, Víctor (El chido) y Sara.

Becarios:

Jared, Melissa. Gracias por el apoyo y el tiempo compartido en el laboratorio.

Compañeras:

Amigas: muchas gracias por su apoyo, por las largas pláticas, por no dejar morir a nadie y porque siempre le sacamos provecho a la peor de las tragedias. Magda, gracias por siempre tener el recuerdo necesario en el momento adecuado.

Fraga, Samantha... muchas gracias por todo.

Técnicas del HPLC:

Marivel, muchas gracias por tus conocimientos compartidos sobre los cromas y por el apoyo que siempre me brindaste.

Carolina, gracias por tu ayuda hasta en los últimos momentos de la tesis.

Ivonne, gracias por escucharme siempre y de vez en cuando prestarme material del laboratorio.

Personal administrativo y de apoyo:

Selene, Jovanna, Sarahí y Dorita, gracias por todas las cotizaciones y apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

Profesores de posgrado:

A todos los profesores les agradezco el compartir conmigo sus conocimientos durante mi paso por el posgrado.

Dr. Alejandro (Coordinador), Dra. Verónicas Rivas, Dra. Rocío Álvarez, gracias por el apoyo brindado.

Conacyt:

Por la beca otorgada durante los estudios de posgrado (Beca No. 256711).

**DESARROLLO DE UNA FIBRA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA BASADA EN LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA EXTRACCIÓN
DE RESIDUOS DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y
DE CUIDADO PERSONAL**

Presentada por:

M. C. OMAR JASSIEL PORTILLO CASTILLO

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Marsela Garza Tapia y la co-dirección de la Dra. C. Rocío Castro Ríos.



Dra. C. Marsela Garza Tapia
Director de tesis



Dra. C. Rocío Castro Ríos
Co-Director de tesis

RESUMEN

M.C. Omar Jassiel Portillo Castillo
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Julio del 2020

Título de Estudio:

**DESARROLLO DE UNA FIBRA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
BASADA EN LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA EXTRACCIÓN DE RESIDUOS
DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y DE CUIDADO PERSONAL**

Número de páginas: 234

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con Orientación en Química Biomédica**

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y método de estudio: En el presente trabajo, se evaluó el uso del líquido iónico (IL) tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio (DMIM-BF₄) y diversos adhesivos comerciales, como recubrimientos de fibras de microextracción en fase sólida (SPME). La fibra seleccionada se fabricó en base al IL y al adhesivo UHU. Se utilizó como soporte un alambre de acero inoxidable recubierto a través del método de inmersión-aglutinación. Dicha fibra presentó una buena estabilidad mecánica y uniformidad del recubrimiento, con un espesor promedio de 7.12 µm. La fibra se utilizó para la extracción de residuos de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) de muestras de agua potable por la modalidad de inmersión directa (DI), mostrando afinidad hacia los compuestos metilparabeno, propilparabeno, naproxeno, diclofenaco y benzofenona-3. La fibra presentó buena reproducibilidad entre la misma fibra y de fibra a fibra, con valores de desviación estándar relativa (DER) <16 %, sin embargo, después del tercer procedimiento disminuía su capacidad de extracción. El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos y el método de SPME se optimizó por medio de diseño de experimentos. Se obtuvo un método lineal ($r^2 \geq 0.995$), preciso y exacto, en un rango de 0.5-15 µg mL⁻¹ con los límites de detección y de cuantificación que oscilaron entre 0.023-0.093 µg mL⁻¹ y 0.070-0.279 µg mL⁻¹, respectivamente. El método propuesto mostró eficiencia de extracción para los PPCPs estudiados con una reproducibilidad aceptable (DER < 20 %) y recuperaciones en el rango de 3.0-184 %.

Contribuciones y conclusiones: Se fabricó una fibra de SPME de soporte metálico con recubrimiento a base de una mezcla de DMIM-BF₄ + UHU y fue aplicada exitosamente a la extracción de PPCPs de muestras de agua potable.

DIRECTOR

Dra. C. Marsela Garza Tapia

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Nombre	Pág.
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Técnicas de preparación de muestra.....	1
1.2	Microextracción en fase sólida en fibra (SPME en fibra).....	4
1.3	Recubrimientos de las fibras de SPME.....	6
1.4	Líquidos Iónicos.....	9
1.5	Recubrimiento de fibras de SPME empleando líquidos iónicos...	11
1.6	Productos farmacéuticos y de cuidado personal.....	17
1.7	Analitos modelo.....	22
2	JUSTIFICACIÓN	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo general	25
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAL Y MÉTODOS	27
4.1	Reactivos.....	27
4.1.1	Líquido iónico.....	27
4.1.2	Estándares de PPCPs.....	27
4.1.3	Adhesivos.....	28
4.1.4	Disolventes y otros reactivos.....	28
4.2	Equipos.....	29
4.2.1	Cromatógrafos.....	29
4.2.2	Equipos en general.....	30

4.3	Materiales.....	31
4.3.1	Columnas cromatográficas.....	31
4.3.2	Materiales de soporte para la fibra de SPME.....	31
4.3.3	Materiales en general.....	31
4.4	Metodología.....	33
4.4.1	Desarrollo del método cromatográfico.....	33
4.4.2	Selección del método cromatográfico óptimo para el análisis de los PPCPs modelo.....	35
4.4.3	Validación del sistema cromatográfico seleccionado...	37
4.4.4	Fabricación de la fibra de SPME.....	41
4.4.4.1	Desgaste de los alambres de acero inoxidable	41
4.4.4.2	Selección del adhesivo para formar la mezcla de recubrimiento.....	43
4.4.4.3	Recubrimiento de los alambres desgastados...	44
4.4.4.4	Recubrimiento de los fragmentos de sílice....	44
4.4.5	Caracterización de la fibra de SPME.....	45
4.4.5.1	Uniformidad del recubrimiento.....	45
4.4.5.2	Espesor del recubrimiento.....	45
4.4.5.3	Selección del recubrimiento de la fibra de SPME.....	46
4.4.5.4	Caracterización del recubrimiento seleccionado por Espectrofotometría de Infrarrojo.....	46
4.4.5.5	Análisis elemental del soporte metálico antes y después del recubrimiento.....	46
4.4.5.6	Estabilidad del recubrimiento seleccionado frente a distintos disolventes y soluciones con diferentes valores de pH.....	47
4.4.5.7	Capacidad de extracción del recubrimiento seleccionado.....	50
4.4.6	Evaluación de la competencia de los analitos hacia la fibra.....	51

4.4.7	Desempeño de la fibra en extracciones consecutivas....	51
4.4.8	Establecimiento del método de extracción de los analitos modelo por SPME en modalidad de inmersión directa.....	52
4.4.8.1	Optimización de la extracción.....	52
4.4.8.2	Optimización de la desorción.....	55
4.4.9	Evauación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción de diferentes fibras bajo las condiciones óptimas establecidas.....	57
4.4.10	Validación del método de SPME por inmersión directa	58
4.4.11	Aplicabilidad del método.....	59
4.4.11.1	Recolección de las muestras.....	59
4.4.11.2	Análisis de las muestras.....	60
5	RESULTADOS	61
5.1	Desarrollo del método cromatográfico.....	61
5.1.1	Métodos desarrollados empleando la columna Kinetex PFP	61
5.1.2	Métodos desarrollados empleando la columnaAtlantis dC ₁₈	64
5.1.3	Métodos desarrollados empleando la columna Discovery HSF5.....	67
5.2	Selección del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de los PPCPs modelo.....	69
5.3	Validación del sistema cromatográfico.....	73
5.4	Fabricación de la fibra de SPME.....	75
5.4.1	Desgaste de los alambres de acero inoxidable.....	75
5.4.2	Selección del adhesivo para formar la mezcla de recubrimiento.....	80
5.4.3	Recubrimiento de los alambres desgastados.....	82
5.4.4	Recubrimiento de los fragmentos de sílice.....	85
5.5	Caracterización de la fibra de SPME.....	86

5.5.1	Uniformidad y espesor del recubrimiento.....	86
5.5.2	Selección del recubrimiento de la fibra de SPME.....	89
5.5.3	Caracterización del recubrimiento seleccionado por Espectrofotometría de Infrarrojo.....	90
5.5.4	Análisis elemental del soporte metálico antes y después del recubrimiento.....	91
5.5.5	Estabilidad del recubrimiento seleccionado frente a distintos disolventes y soluciones con diferentes valores de pH.....	94
5.5.6	Capacidad de extracción del recubrimiento seleccionado.....	98
5.6	Evaluación de la competencia de los analitos hacia la fibra.....	101
5.7	Desempeño de la fibra en extracciones consecutivas.....	110
5.8	Establecimiento del método de extracción de los analitos modelo por SPME en modalidad de inmersión directa.....	113
5.8.1	Optimización de la extracción.....	113
5.8.2	Optimización de la desorción.....	120
5.9	Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción de diferentes fibras bajo las condiciones óptimas.....	128
5.10	Validación del método de SPME por inmersión directa.....	132
5.11	Aplicabilidad del método: análisis de muestras.....	135
6	DISCUSIÓN	138
6.1	Desarrollo del método cromatográfico.....	138
6.1.1	Métodos desarrollados empleando la columna Kinetex PFP.....	140
6.1.2	Métodos desarrollados empleando la columna Atlantis dC ₁₈	141
6.1.3	Métodos desarrollados empleando la columna Discovery HSF5.....	143
6.2	Selección del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de los PPCPs modelo.....	145

6.3	Validación del sistema cromatográfico.....	147
6.4	Fabricación de la fibra de SPME.....	150
6.4.1	Desgaste de los alambres de acero inoxidable.....	150
6.4.2	Selección del adhesivo para formar la mezcla de recubrimiento.....	153
6.4.3.	Recubrimiento de los alambres desgastados.....	154
6.4.4	Recubrimiento de los fragmentos de sílice.....	156
6.5	Caracterización de la fibra de SPME.....	158
6.5.1	Uniformidad y espesor del recubrimiento.....	158
6.5.2	Caracterización del recubrimiento seleccionado por Espectrofotomertría de Infrarrojo.....	160
6.5.3	Análisis elemental del soporte metálico antes y después del recubrimiento.....	161
6.5.4	Estabilidad del recubrimiento frente a distintos disolventes y soluciones con diferentes valores de pH..	162
6.5.5	Capacidad de extracción del recubrimiento seleccionado.....	164
6.6	Evaluación de la competencia de los analitos hacia la fibra.....	168
6.7	Desempeño de la fibra en extracciones consecutivas.....	171
6.8	Establecimiento del método de extracción de los analitos modelo por SPME en modalidad de inmersión directa.....	173
6.8.1	Optimización de la extracción.....	173
6.8.2	Optimización de la desorción.....	180
6.9	Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción de diferentes fibras bajo las condiciones óptimas.....	183
6.10	Validación del método de SPME por inmersión directa.....	186
6.11	Aplicabilidad del método: análisis de las muestras.....	188
6.12	Comparación del método propuesto con otros similares.....	195

7	CONCLUSIONES	199
8	PERSPECTIVAS	201
9	REFERENCIAS	202
10	ANEXOS	225
10.1	Cromatogramas obtenidos en la columna Atlantis dC18.....	225
10.2	Cromatogramas obtenidos en la columna Discovery HSF5.....	228

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pág.
1	Características de las fibras de SPME comercialmente disponibles	7
2	Fibras de SPME basada en ILs fabricadas por la metodología de inmersión-aglutinación y sus aplicaciones.	16
3	Compuestos considerados PPCPs.	17
4	Analitos modelo y sus valores de Log P y pKa.	23
5	Longitudes de onda de detección de los analitos modelo.	33
6	Mezclas evaluadas en las pruebas de solubilidad del adhesivo.	43
7	Gradiente utilizado en el sistema cromatográfico para los estudios de estabilidad del recubrimiento de la fibra en mezclas de disolventes.	49
8	Gradiente utilizado en el sistema cromatográfico para los estudios de estabilidad del recubrimiento de la fibra en soluciones con diferentes valores de pH.	50
9	Variables incluidas en el diseño de experimentos de la extracción.	53
10	Diseño de experimentos de la extracción.	53
11	Variables incluidas en el diseño de experimentos de la desorción.	55
12	Diseño de experimentos de la desorción.	56
13	Condiciones seleccionadas para el análisis de PPCPs en la columna Kinetex PFP.	63
14	Condiciones seleccionadas para el análisis de PPCPs en la columna Atlantis dC ₁₈ .	66
15	Condiciones seleccionadas para el análisis de PPCPs en la columna Discovery HSF5.	68
16	Parámetros cromatográficos obtenidos para la separación de los PPCPs modelo utilizando los métodos cromatográficos desarrollados en las columnas Kinetex PFP, Atlantis dC ₁₈ y Discovery HSF5.	70

17	Condiciones cromatográficas óptimas seleccionadas para el análisis de los PPCPs en el cromatógrafo Waters 2695.	71
18	Resultados de la validación del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de los ocho PPCPs.	74
19	Condiciones de tratamiento para el desgaste de los alambres.	78
20	Condiciones de solubilidad de los adhesivos seleccionados.	80
21	Miscibilidad entre adhesivos y el líquido iónico DMIM-BF ₄ .	81
22	Condiciones óptimas del proceso de recubrimiento 1.4 cm de los alambres desgastados para la fabricación de la fibra de SPME.	83
23	Medida de los espesores de los recubrimientos de las fibras fabricadas.	88
24	Condiciones óptimas del proceso de recubrimiento de 2.0 cm de los alambres desgastados para fabricar la fibra de SPME.	89
25	Análisis elemental del soporte desgastado sin recubrimiento.	92
26	Análisis elemental del soporte desgastado con recubrimiento.	93
27	Condiciones óptimas seleccionadas para el análisis de los cinco PPCPs extraídos con las fibras fabricadas.	104
28	Tiempos de retención obtenidos para los cinco PPCPs extraídos con las fibras fabricadas.	105
29	Resultados de la validación del sistema cromatográfico para el análisis de los cinco PPCPs extraídos.	107
30	Variables utilizadas en la optimización de la cantidad de NaCl en la extracción.	116
31	Variables utilizadas en la optimización del tipo de disolvente y el tiempo de desorción.	124
32	Condiciones óptimas del método de SPME por inmersión directa para el análisis de los PPCPs incluidos en este estudio.	127
33	Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción dentro de fibras del mismo lote.	130
34	Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción entre fibras de diferente lote.	131

35	Resultados de la validación del método de SPME por inmersión directa para el análisis de los PPCPs estudiados.	133
36	Resultados obtenidos de los PPCPs en el análisis de las muestras (M1 – M5).	136
37	Resultados obtenidos de los PPCPs en el análisis de las muestras (M6 – M10).	136
38	Resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico de las muestras 1, 2 y 3.	192
39	Comparación del método propuesto con otros métodos para la extracción y análisis de PPCPs.	198

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pág.
1	Clasificación de las técnicas de microextracción en fase sólida.	3
2	Diagrama de la extracción y desorción de la SPME en fibra.	5
3	Cationes y aniones más utilizados en la síntesis de ILs.	10
4	Diagrama del método de inmersión – aglutinación.	12
5	Montaje utilizado para el desgaste de los alambres de acero inoxidable	42
6	Montaje de la fibra fabricada en una jeringa de 1 mL.	48
7	Cromatogramas obtenidos para un estándar de Metformina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Columna Kinetex PFP, flujo de 0.15 mL min^{-1} , 35°C y fase móvil: buffer de formiatos 40 mM (pH 4) y metanol (10 y 1 %).	62
8	Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) bajo las condiciones de la Tabla 13.	62
9	Cromatograma obtenido para una una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Columna Atlantis dC ₁₈ , flujo de 0.2 mL min^{-1} , 40°C y gradiente inicial de 1 % de acetonitrilo.	64
10	Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) bajo las condiciones de la Tabla 14.	65
11	Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) bajo las condiciones de la Tabla 15.	67
12	Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en cromatógrafo Waters 2695 bajo las condiciones de la Tabla 15.	68
13	Cromatograma obtenido para una solución estándar de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en buffer de formiatos 40 mM (pH4) y metanol (70:30) bajo las condiciones de la Tabla 17.	72
14	Fotografía de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HNO_3 15 N.	75
15	Fotografía de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con NaOH 5 N.	76

16	Fotografía de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HCl 12 N a los 10 y 20 min, respectivamente.	77
17	Alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HCl 5 N a los diferentes tiempos evaluados.	78
18	Electromicrofotografías de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, a) sin tratamiento y b) después del tratamiento con HCl 5 N bajo las condiciones señaladas en la Tabla 19.	79
19	Fotografía del recubrimiento del alambre desgastado con la mezcla DMIM-BF ₄ + Nafion.	82
20	Microfotografía de la fibra con recubrimiento DMIM-BF ₄ + Silicón Pelikan.	84
21	Microfotografía de la fibra con recubrimiento DMIM-BF ₄ + UHU.	84
22	Fotografía de los fragmentos de sílice recubiertos con la mezcla de DMIM-BF ₄ + UHU: a) Sílice sin tratamiento y b) Sílice con tratamiento.	85
23	Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF ₄ + Silicón Pelikan a un aumento de 250x, en donde se pueden distinguir las dos zonas de recubrimiento.	86
24	Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF ₄ + Silicón Pelikan a un aumento de 1000x, la cual muestra distintas zonas de recubrimiento y el espesor de las mismas.	87
25	Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF ₄ + UHU a un aumento de 250x.	87
26	Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF ₄ + UHU a un aumento de 1000x, en donde se puede observar la zona de recubrimiento, así como la medida de su espesor.	88
27	a) Espectro infrarrojo del UHU, b) Espectro infrarrojo del líquido iónico DMIM-BF ₄ y c) Espectro infrarrojo de la mezcla de recubrimiento formada por el DMIM-BF ₄ + UHU.	90
28	Área en donde se llevó a cabo el análisis elemental del soporte metálico desgastado antes de recubrirlo y espectro de energía dispersiva de Rayos X obtenido.	91
29	Área en donde se llevó a cabo el análisis elemental del soporte metálico desgastado después de recubrirlo y espectro de energía dispersiva de Rayos X obtenido.	92

30	a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF ₄ -metanol y b) Cromatograma obtenido para una mezcla agua-metanol (80:20) después de la inmersión de la fibra.	95
31	a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF ₄ -acetonitrilo y b) Cromatograma obtenido para una mezcla agua-acetonitrilo (80:20) después de la inmersión de la fibra.	95
32	Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF ₄ en metanol y solución amortiguadora pH3 (60:40) y b) Cromatograma obtenido para la solución de pH 3 después de la inmersión de la fibra.	97
33	a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF ₄ en metanol y solución amortiguadora pH 9 (60:40) y b) Cromatograma obtenido para la solución de pH 9 después de la inmersión de la fibra.	97
34	Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs (2 µg mL ⁻¹) extraídos con la Fibra recubierta con UHU, bajo las condiciones de la Tabla 17.	99
35	Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs (2 µg mL ⁻¹) extraídos con la Fibra recubierta con DMIM-BF ₄ + UHU, bajo las condiciones de las Tabla 17.	99
36	Comparación de la capacidad extractante de fibras recubiertas solo con UHU y fibras recubiertas con DMIM-BF ₄ + UHU.	100
37	Comparación de la extracción de soluciones estándar de los analitos a una concentración de 2 µg mL ⁻¹ individuales y en mezcla con la fibra recubierta con DMIM-BF ₄ + UHU.	102
38	a) Cromatogramas obtenidos de los estándares individuales de MET, CAF y BP-4, b) Cromatogramas obtenidos de los estándares de MET, CAF y BP-4 extraídos, ambos bajo las condiciones de la Tabla 17.	103
39	Cromatograma obtenido para una solución estándar de PPCPs (10 µg mL ⁻¹) en buffer de formiatos 40 mM (pH 4) y metanol (70:30), bajo las condiciones de la Tabla 27.	106
40	Comparación de la eficiencia de extracción de fibras recubiertas con 1.4 y 2.0 cm de fase extractante.	109
41	Comparación del desempeño de la fibra en extracciones consecutivas.	111
42	Cromatograma obtenido para una mezcla de extracción de PPCPs (2 µg mL ⁻¹) con la Fibra recubierta con la mezcla UHU + DMIM-BF ₄ , bajo las condiciones de la Tabla 15.	112

43	Cromatograma obtenido para una mezcla de extracción de PPCPs ($2\ \mu\text{g mL}^{-1}$) con la Fibra recubierta con la mezcla UHU + DMIM- BF_4 , bajo las condiciones de la Tabla 15.	112
44	Gráficos de coeficiente escalados y centrados para el efecto estandarizado de los factores tiempo, temperatura, agitación, fuerza iónica y tipo de sal, evaluados en la optimización de la extracción de los PPCPs estudiados.	114
45	Fibra utilizada en el efecto de “salting out” con Na_2CO_3 .	115
46	Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de los factores cantidad de sal añadida y temperatura en la optimización de la extracción de los PPCPs estudiados.	118
47	Efecto de la concentración de NaCl sobre la eficiencia de la extracción.	119
48	Gráficos de coeficiente escalados y centrados para el efecto estandarizado de los factores tipo de disolvente, proporción de disolvente y tiempo de desorción, evaluados en la optimización de la desorción de los PPCPs estudiados.	121
49	Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de tipo de disolvente y tiempo de desorción en la optimización de la desorción de los PPCPs estudiados.	123
50	Comparación de la eficiencia de desorción a diferentes tiempos y tipos de disolventes.	125
51	Comparación de la eficiencia de desorción a los 30 minutos (Exp. 3A y Exp. 3B) y diferente tipo de disolvente.	126
52	Cromatograma obtenido para la extracción de una solución estándar de PPCPs ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$) en buffer de formiatos 40 mM (pH 4) y metanol (70:30), bajo las condiciones de la Tabla 27. Detección a 270 nm.	134
53	a) Cromatograma obtenido de la extracción de la muestra 1(M1) sin adición de PPCPs y b) Cromatograma obtenido de la extracción de la misma muestra enriquecida a $1.5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de PPCPs, bajo las condiciones de la Tabla 27. Detección a 270 nm. Detección a 270 nm.	137
54	Estructuras químicas de los componentes de la fase extractante.	165

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
As	Factor de asimetría
BMIM-PF ₆	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio
BP-3	Benzofenona-3
BP-4	Benzofenona-4
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos
CAF	Cafeína
CAR	Carboxen
CW-PEG	Carbowax-Polietilenglicol
C ₁₈	Octadecilsilano
DAD	Detector de arreglo de diodos
DE	Desviación estándar
DI	Inmersión directa
DIC	Diclofenaco
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DVB	Divibilbenceno
EeMIM-NTf ₂	Bis(trifluorometil)sulfonil imida de 1-etoxietil-3-metilimidazolio
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
FE	Factor de enriquecimiento
FR	Factor de respuesta

GC	Cromatografía de gases (del inglés, Gas Chromatography)
GC-FID	Cromatógrafo de Gases con Detector de Ionización de Flama (del inglés, Gas Chromatography-Flame Ionization Detector)
GC-MS	Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometómetro de Masas (del inglés, Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HMIM-FAP	Tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (del inglés, High-Performance Liquid Chromatohraphy)
HS	Headspace
IL	Líquido iónico
ILs	Líquidos iónicos
in	Pulgadas
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
LC-MS	Cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas (del inglés, High-Performance Liquid Chromatohraphy-Mass Spectrometry)
Log P	Coeficiente de partición (octanol/agua)
MET	Metformina
MeOH	Metanol
MP	Metilparabeno
mL min ⁻¹	Mililitros por minuto
N	Número de platos teóricos
NAP	Naproxeno

NR	No reportado
OMIM-BF ₄	Tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio
OMIM-PF ₆	Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio
OMIM-TfO	Trifluorometanosulfonato de 1-octil-3-metilimidazolio
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación
PP	Propilparabeno
ppb	Partes por billón
PPCPs	Productos farmacéuticos y de cuidado personal
ppt	Partes por trillón
R	Recuperación
R _s	Resolución
SBSE	Extracción adsorbente en barra de agitación
SPE	Extracción en fase sólida
TFME	Microextracción en película delgada
TR	Resina templada
t _R	Tiempo de retención
UV-Vis	Ultravioleta – visible
°C	Grados Celsius
μm	Micrómetros
μg mL ⁻¹	Microgramos por mililitro
% DER	Porcentaje de desviación estándar relativa

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Técnicas de preparación de muestra

Los procedimientos analíticos comprenden diversos pasos igualmente importantes como lo son el muestreo, la selección del método de análisis, el tratamiento o preparación de la muestra, la identificación y/o cuantificación de los analitos y el manejo de los datos resultantes. Comúnmente la preparación de la muestra es la etapa más larga y laboriosa dentro del análisis químico y afecta significativamente la fiabilidad y exactitud de los resultados [Gary, 2009]. En esta etapa se hace uso de un grupo de técnicas de preparación de muestra cuyos principales objetivos son: aislar al analito de la matriz de la muestra para hacerlo compatible con el sistema de análisis y lograr su preconcentración, favoreciendo el aumento de la sensibilidad en el método desarrollado [Spietelun et al., 2014].

Cuando se aplican técnicas convencionales como la extracción líquido – líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE), surgen algunos inconvenientes, como lo son: los largos tiempos de análisis, procedimientos muy laboriosos, gran cantidad de muestra utilizada y el uso de solventes tóxicos los cuales generan numerosos residuos [Boyaci et al., 2015].

Actualmente, la Química Analítica busca simplificar o eliminar los inconvenientes generados por las técnicas convencionales de preparación de muestra; lo que ha llevado al desarrollo de metodologías miniaturizadas llamadas técnicas de microextracción, las cuales son definidas como procedimientos no exhaustivos, que emplean volúmenes o cantidades pequeñas de fase extractante [Torres et al., 2014]. Estas técnicas generalmente son simples, selectivas, algunas son libres de solventes, y altamente compatibles con los instrumentos analíticos.

Las técnicas de microextracción son muy variadas, destacando entre ellas la microextracción en fase sólida (SPME) [Kataoka, 2010]. Típicamente en la SPME, la fase extractante se encuentra soportada, inmovilizada o formando un recubrimiento en algún material sólido con diferente configuración geométrica. En la Figura 1 se muestra la clasificación de los tipos de SPME de acuerdo al dispositivo empleado para la inmovilización de la fase extractante, siendo de particular interés para el desarrollo de este trabajo la SPME en fibra [Pereira et al., 2014].

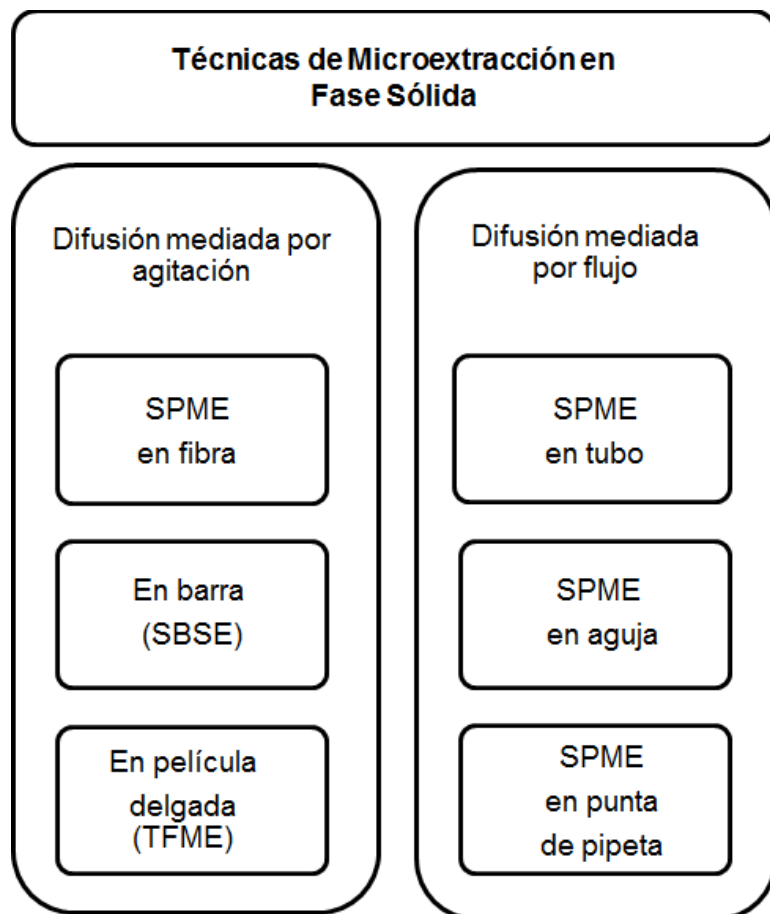


Figura 1. Clasificación de las técnicas de microextracción en fase sólida.

1.2 Microextracción en fase sólida en fibra (SPME en fibra)

La SPME en fibra, fue introducida en la década de los 90's por Pawliszyn y colaboradores [Arthur y Pawliszyn, 1990]. En este tipo de SPME la fase extractante se encuentra inmovilizada en una fibra, la cual puede ser de sílice fundida o de algún material metálico.

Esta técnica es considerada un proceso no exhaustivo, basado en el equilibrio de partición de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase extractante. Una vez alcanzado el equilibrio, la cantidad de analito extraído es constante y directamente proporcional a la concentración en la muestra. [Mehdinia y Aziz, 2013; Pawliszyn, 2010].

Dentro de las ventajas que presenta la SPME, destaca su capacidad de integrar en un solo paso el muestreo, la extracción, la preconcentración de los analitos y, en algunos casos, la introducción directa de la muestra en el sistema de análisis. La SPME en fibra es una técnica sencilla, ya que existe poca manipulación de la muestra, es fácilmente automatizable y económica, esto último debido a que el dispositivo de extracción puede ser reutilizable y es una técnica prácticamente libre de solventes, lo que genera poca generación de residuos. Además, permite el análisis de muestras sólidas, líquidas y gaseosas [Souza et al., 2015; Pan et al., 2014].

La SPME es llevada a cabo en dos etapas: la extracción del analito de la muestra y la desorción del mismo seguido de su análisis. El proceso de extracción consiste en la migración del analito de la matriz de la muestra a la fase extractante y puede llevarse a cabo de dos formas, por inmersión directa (DI) o por contacto con el headspace (HS) (Figura 2). En DI, la fibra es colocada en el seno de la matriz de la muestra y los

analitos son transferidos directamente hacia la fase extractante. Mientras que en la modalidad de HS la muestra líquida o sólida se coloca en un recipiente cerrado herméticamente y los analitos son transferidos de la muestra al espacio aéreo gaseoso superior (headspace), generalmente con ayuda de calentamiento. La fibra es expuesta a dicho espacio del cual extrae a los analitos contenidos [Kataoka y Saito, 2011; Płotka et al., 2015]. Por otra parte, la desorción es el proceso mediante el cual el analito es recuperado del recubrimiento o fase extractante de la fibra, para su posterior análisis. Cuando se trata de analitos volátiles este procedimiento puede realizarse por temperatura, generalmente en el inyector del cromatógrafo de gases; o por medio del uso de solventes cuando los analitos son no volátiles en un vial o en línea con el cromatógrafo de líquidos (Figura 2).

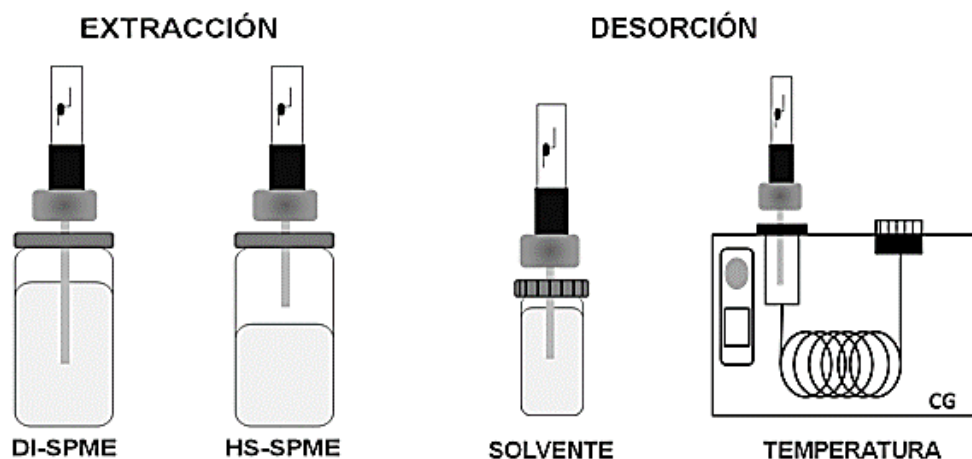


Figura 2. Diagrama de la extracción y desorción de la SPME en fibra.

1.3 Recubrimientos de las fibras de SPME

La naturaleza fisicoquímica y el espesor del recubrimiento de la fibra (fase extractante), son factores que afectan directamente la constante de distribución de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase extractante, afectando el rendimiento, sensibilidad, selectividad y reproducibilidad del método de extracción [Spiegel et al., 2010].

En general, la selección del recubrimiento de la fibra depende del peso molecular del analito, de su polaridad y volatilidad, así como de la complejidad de la matriz de la muestra. [Vas y Vékey, 2004]. El recubrimiento de las fibras está formado generalmente por adsorbentes sólidos (CAR, DVB, TR), polímeros líquidos (PDMS, PA, CW-PEG, C₁₈) o la combinación de ambos. En la Tabla 1, se muestran algunas características de las fibras comercialmente disponibles.

El número de recubrimientos de fibras de SPME comercialmente disponibles es limitado, esto ha representado un inconveniente para la aplicación y expansión de la técnica, ya que presentan limitaciones en cuanto a su selectividad, temperatura de operación, incompatibilidad con algunos solventes o diferentes matrices, además de que la mayoría de las fibras presentan dificultades para la extracción de compuestos altamente polares y no volátiles [Souza et al., 2013].

Tabla 1. Características de las fibras de SPME comercialmente disponibles.

Fibra (recubrimiento)	Grosor de recubrimiento (μm)	Compuestos analizados
PDMS	7, 30, 100	No polares, volátiles
PDMS/DVB	60, 65	No polares a medianamente polares, volátiles, aminas y compuestos aromáticos
CAR/PDMS	75, 85	Compuestos de bajo peso molecular, volátiles
DVB/CAR/PDMS	50,30	Compuestos volátiles y semi-volátiles
PA	85	Polares, semi-volátiles
CW-PEG	60	Polares, volátiles
C₁₈	45	No polares, bajo peso molecular

*[Sigma, 2016]

Por lo tanto, debido a los inconvenientes que presentan los recubrimientos convencionales y con la finalidad de aumentar la resistencia física y química de las fibras, así como incrementar su selectividad y sensibilidad, se han desarrollado nuevos recubrimientos con materiales que presentan una mayor variabilidad en su composición química. Por ejemplo, se han publicado recientemente revisiones específicas sobre el uso de nanomateriales basados en el carbono, polímeros molecularmente impresos, nanopartículas metálicas, materiales con estructura órgano-metálica, materiales basados en óxidos metálicos, polímeros electroconductores, líquidos iónicos y sus derivados poliméricos, principalmente [Xu et al., 2013].

Estos nuevos materiales pueden ser inmovilizados en fibras de sílice fundida, alambres de acero inoxidable o algún otro soporte, mediante procedimientos electroquímicos [Wu y Pawliszyn, 2001; Farajzadeh y Rahmani, 2005; Liu et al., 2010], deposición física [Liu et al., 2005], por medio de la tecnología sol-gel [Chong et al., 1997; Azenha et al., 2006], por modificación química de la fibra [Liu et al., 2009; Feng et al., 2011], crecimiento hidrotérmico [Wang et al., 2009; Ji et al., 2012] o incluso simplemente mediante el uso de algún pegamento [He et al., 2009] o aglutinante [Lü et al., 2007].

En general, el uso de estos nuevos materiales como recubrimientos, ha permitido desarrollar fibras más económicas, más resistentes y de mayor selectividad debido a las características fisicoquímicas de los mismos; logrando así superar algunas de las desventajas de las fibras comerciales y ampliar la aplicación de la técnica en un mayor número de analitos y matrices [Aziz y Mehdinia, 2014].

1.4 Líquidos Iónicos

Como se mencionó anteriormente, algunos de los materiales que se han empleado en la fabricación de nuevos recubrimientos para las fibras de SPME son los líquidos iónicos (ILs). Estos compuestos son sales orgánicas, las cuales poseen puntos de fusión menores a 100 °C, están constituidos por un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico; los cuales son por lo general muy voluminosos, lo que hace que las fuerzas de cohesión no sean tan fuertes entre ellos originando que presenten puntos de fusión bajos [Vičkačkaitė y Padarauskas, 2012].

Los ILs poseen interesantes propiedades fisicoquímicas, como una alta estabilidad térmica, despreciable presión de vapor, son no inflamables, presentan buena conductividad y una viscosidad variable, lo que ha hecho posible su aplicabilidad en diversas áreas [Ho et al., 2014]. Debido a su composición iónica poseen una naturaleza dual lo que les permite tener la capacidad de experimentar interacciones tanto con moléculas polares como no polares [Poole y Lenca, 2015]. Las distintas propiedades de los ILs pueden ser modificadas al variar el anión o el catión en la estructura, por lo que se les considera solventes de diseño. En general, la gran cantidad de combinaciones posibles para generar un IL, permite considerar las diferentes interacciones con distintos tipos de analitos y solventes, lo que los ha convertido en buenos candidatos para ser empleados como solventes de extracción alternativos en muchas técnicas de preparación de muestra [Aguilera et al., 2010]. En la Figura 3 se presentan las estructuras de algunos de los cationes y aniones más utilizados en la síntesis de los ILs.

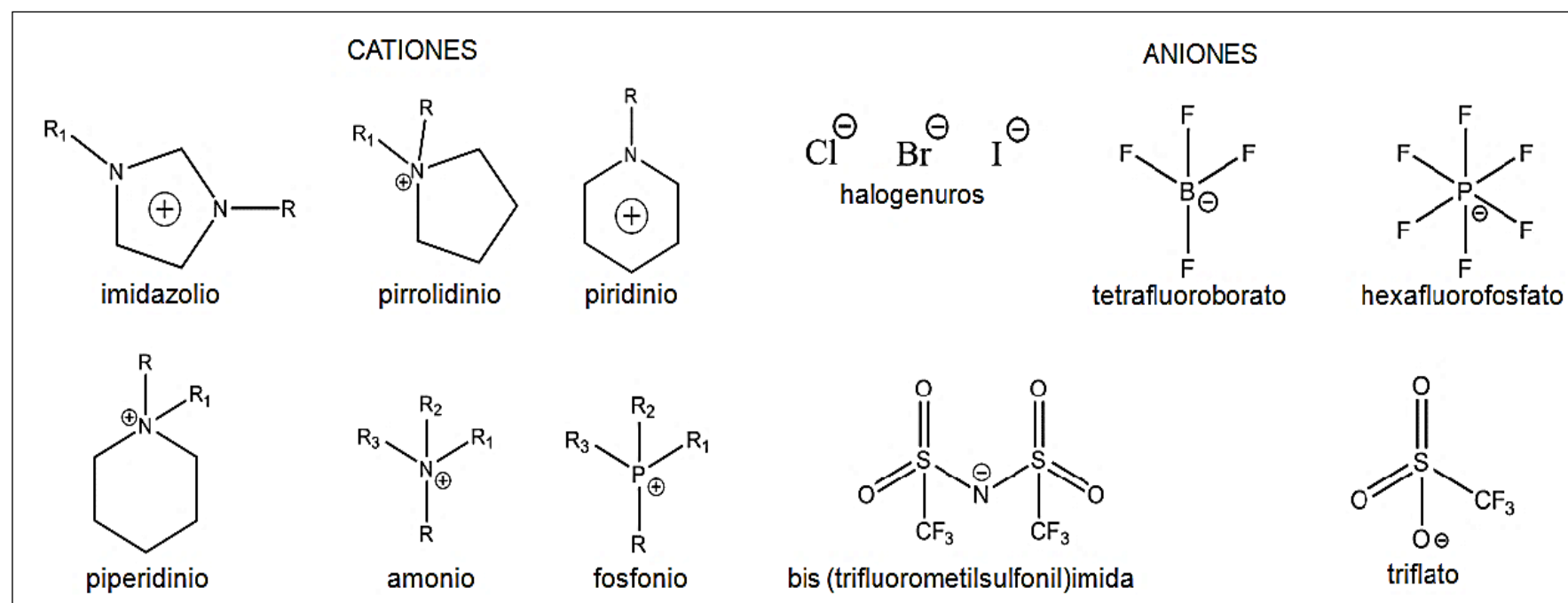


Figura 3. Cationes y aniones más utilizados en la síntesis de ILs.

1.5 Recubrimiento de fibras de SPME empleando líquidos iónicos

Entre el gran número de aplicaciones que se les han dado a los ILs en la preparación de muestra, destaca su empleo como recubrimiento en fibras de SPME. Existen reportes que indican que la alta viscosidad de los ILs contribuye a generar un mejor revestimiento de las fibras de SPME, aumentando la integridad y la homogeneidad de la película formada; al mismo tiempo, su estado líquido favorece el proceso de extracción debido a que se facilita la difusión de los analitos de la matriz de la muestra a la fase extractante [Yavir et al., 2019]. Por otra parte, la elevada estabilidad térmica de los ILs, hace que las fibras desarrolladas en base a estos compuestos presenten una mayor resistencia y una vida media más larga que algunas fibras convencionales [Aguilera et al., 2010].

Las fibras desarrolladas en base a ILs han sido fabricadas por medio de metodologías basadas en procesos físicos y/o químicos, como son: el método de inmersión-aglutinación para recubrir fibras de sílice [Amini et al., 2011; Ho et al., 2012] y metálicas [Shi et al., 2016], tecnología sol-gel [Zhou et al., 2012] y por modificación química de la fibra [Zhang et al., 2012], entre otras. De estas metodologías, la de inmersión – aglutinación es la más simple, rápida, sencilla y económica [Aziz y Mehdinia, 2014].

El procedimiento de inmersión – aglutinación, es compatible con todos los materiales adsorbentes. Este método consiste en sumergir la fibra que se desea recubrir durante un tiempo determinado en el material a depositar (Figura 4); en ocasiones, cuando el

material es altamente viscosos es necesario emplear una mezcla de este con algún solvente orgánico; el material depositado se fija en la fibra mientras que el solvente es evaporado [Huang et al., 2009]. En algunos casos, al trabajar con fibras metálicas, en lugar de una deposición mecánica sencilla del recubrimiento sobre la fibra, estas pueden ser cubiertas con una capa del material, como si se estuviesen pintando [Aziz y Mehdinia, 2014].

Por otra parte, se ha demostrado que el desgaste de las fibras metálicas con ácidos o algún reactivo corrosivo permite una mayor penetración y adherencia del IL sobre la superficie [Huang et al., 2009], mediante el método de inmersión – aglutinación. Otra forma de fabricar fibras con mayor grosor de recubrimiento y de mayor resistencia física y química por este método, ha sido el utilizar los ILs en conjunto con un adhesivo o un aglutinante [He et al., 2009; Hsieh et al., 2006].

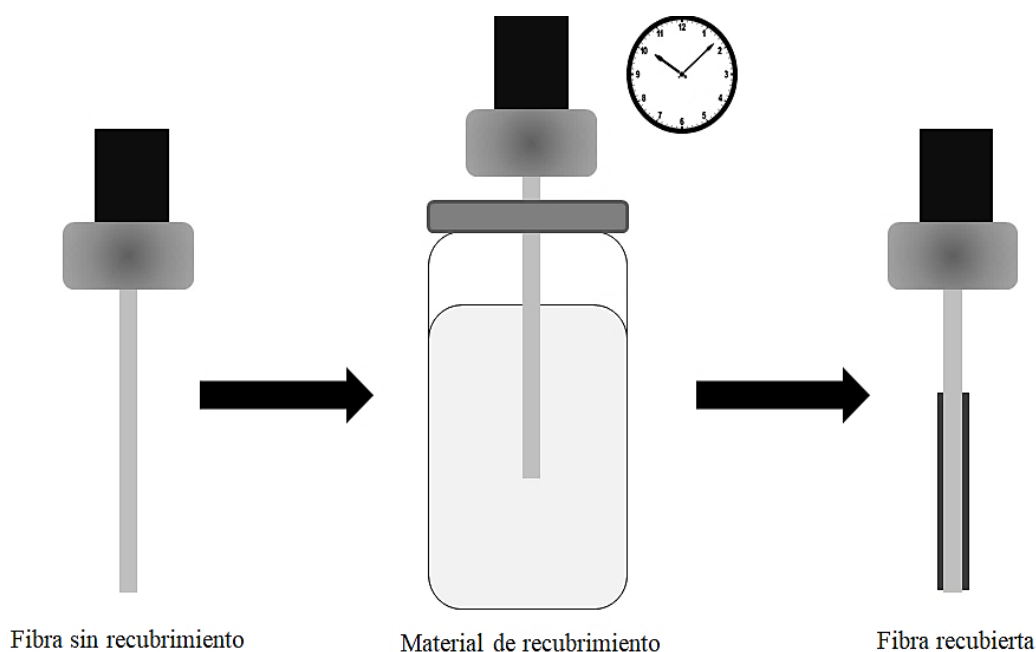


Figura 4. Diagrama del método de inmersión – aglutinación.

Un parámetro a considerar para el desarrollo de nuevas fibras es el grado de hidrofobicidad de los ILs, especialmente para su aplicación por la modalidad de DI. Los ILs más utilizados en el recubrimiento de fibras de SPME han sido los pertenecientes a la familia de los imidazolios con una amplia variedad de aniones [Ho et al., 2011].

El primer reporte del uso de ILs como recubrimientos en fibras de SPME, fue realizado por Liu y colaboradores [Liu et al., 2005], en este trabajo ellos emplearon hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio ([OMIM] [PF₆]) para recubrir fibras de sílice fundida y fibras metálicas, evaluando su desempeño en la extracción de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) en pinturas, por la modalidad de headspace. El análisis de dichos compuestos fue por GC-FID, encontrando recuperaciones en un rango de 70 a 114 % y límites de detección de 0.1 a 0.8 µg mL⁻¹. Este grupo de investigadores recubrieron las fibras por medio de la metodología de inmersión – aglutinación. La fibra seleccionada para los estudios fue la desarrollada en base de sílice, con la cual se obtuvieron límites de detección superiores a los obtenidos con la fibra de PDMS (100 µm), esto debido principalmente al menor grosor de la película de IL obtenida en la fibra fabricada. Los autores mencionan que la principal ventaja de la fibra fabricada es su bajo costo, ya que se consume poca cantidad de IL en el recubrimiento [Liu et al., 2005].

A pesar de obtener buenos resultados en la extracción de diferentes analitos empleando fibras fabricadas por inmersión-aglutinación, existen reportes en los que se considera que una de las desventajas de esta metodología es el hecho de que proporciona fibras

en las que puede haber desprendimiento del IL al aumentar la temperatura y además pueden presentar una pobre resistencia a algunos solventes orgánicos [Aziz y Mehdinia, 2014]. Para superar las desventajas de este método, el material de recubrimiento se ha utilizado en conjunto con un aglutinante o algún material que funcione como adhesivo, colocando una capa de este material en la fibra previo al recubrimiento o colocando ambos materiales mezclados, todo esto con la finalidad de brindar una mayor adhesión del recubrimiento y con ello una mayor resistencia y un mayor grosor de la fibra. Entre los adhesivos o aglutinantes empleados se encuentran resinas epóxicas [Bianchi et al., 2014] y elastómeros de silicón [Huang et al., 2009]; otro es el Nafion, el cual es un polímero de intercambio catiónico, que posee grupos SO_2^- ; dicho polímero, por interacciones electrostáticas con los ILs incrementa la cantidad de IL adsorbido en la superficie de la fibra [He et al., 2009].

En la Tabla 2 se resumen algunos trabajos en los que se han desarrollado diferentes fibras de SPME a base de ILs mediante esta metodología, así como sus aplicaciones. Como se muestra en dicha tabla, las fibras desarrolladas se han aplicado mayormente en procedimientos de extracción por la modalidad de HS y los analitos diana son en su mayor parte de naturaleza no polar. En general la mayoría de los autores refieren que las fibras desarrolladas, son dispositivos económicos, con una buena estabilidad térmica y mecánica, y además presentan una buena capacidad de extracción, comparable e incluso superior a las fibras comercialmente disponibles.

Por lo tanto, tomando en cuenta las diferentes propiedades y ventajas que poseen los ILs, es importante desarrollar y evaluar nuevas fibras de SPME recubiertas con

distintos ILs, que permitan ampliar aún más la aplicabilidad de la SPME, principalmente en procedimientos de DI-SPME.

Si bien ya existen reportes en donde se utilizan ILs para fabricar fibras para extracción por inmersión directa, en general, son solo para una clase de analitos (no polares) [Cui et al., 2015; Shi et al, 2016], por lo tanto, es importante cubrir un mayor rango de polaridades.

Tabla 2. Fibras de SPME basada en ILs fabricadas por la metodología de inmersión-aglutinación y sus aplicaciones.

Fibra / Aglutinante	IL	Modalidad	Analito	Muestra	Recuperación y/o factor de enriquecimiento	Grosor (μm)	Vida media (número extracciones)	Ref.
Capilar de sílice desgastado	BMIM-PF ₆	HS	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Espirales de incienso para mosquito	NR	30	Recubrimiento después de cada extracción	[Huang et al., 2009]
Capilar de sílice-Elastómero de silicón	EeMIM-NTf ₂	HS	Metanfetamina y anfetamina	Orina	R: 89.0 - 113.8 %	50	> 100	[He et al., 2009]
Capilar de sílice-Nafion	OMIM-TfO	HS	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Agua de lluvia y agua subterránea	R: 80 - 110 %	NR	> 50	[Hsieh et al., 2006]
Capilar de sílice	OMIM-BF ₄	HS	Metil terbutil éter	Gasolina	R: 80 - 110 %	12.7	Recubrimiento después de cada extracción	[Amini et al., 2011]
Capilar de sílice	BMIM-PF ₆	HS	Clorofenoles	Lixiviados de depósitos de residuos	R: 87 - 99 %	NR	> 80	[Ho et al., 2012]
Alambre de acero inoxidable desgastado	OMIM-PF ₆	HS	Retardantes de flama organofosforados	Agua de lago, de efluente de planta tratadora y agua de grifo	R: 78.2 - 105.8 %	NR	Recubrimiento después de cada extracción	[Kang et al., 2015]
Alambre de acero inoxidable desgastado	OMIM-PF ₆	DI	Alquilfenoles	Agua de río	FE: 1382 - 4779	NR	NR	[Cui et al., 2015]
Alambre de acero inoxidable desgastado	HMIM-FAP	DI	Ésteres organofosforados	Agua de grifo, agua de efluente y de influente de planta tratadora de agua residual	R: 82.1 - 123 %	NR	> 65	[Shi et al., 2016]

NR: no reportado

1.6 Productos farmacéuticos y de cuidado personal

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs, por sus siglas en inglés), incluyen una amplia variedad de sustancias químicas, incluidos los medicamentos utilizados para prevenir o tratar enfermedades humanas y animales, los agentes de contraste médico-diagnóstico, así como desinfectantes, conservadores o fragancias utilizadas en la fabricación de productos de cuidado personal (por ejemplo en lociones, productos de limpieza del cuerpo, pastas de dientes, cremas, labiales, esmaltes de uñas, maquillajes, repelentes de insectos y protectores solares) y los productos químicos utilizados en el hogar para mejorar la calidad de vida (desinfectantes, aromatizantes, entre otros) [Lin et al.,2016; Birch et al., 2015]. En la Tabla 3, se presenta un listado de algunos de los compuestos considerados dentro del grupo de los PPCPs [Liu y Wong, 2013].

Tabla 3. Compuestos considerados PPCPs.

Tipo	Compuesto
Productos farmacéuticos	Antibióticos
	Hormonas
	Analgésicos
	Antiinflamatorios
	Antiepilépticos
	Reguladores de lípidos de la sangre
	β -bloqueadores
	Medios de contraste de diagnóstico
	Fármacos citostáticos
Productos de cuidado personal	Agentes antimicrobianos
	Desinfectantes
	Almizcles sintéticos/Fragancias
	Repelentes de insectos
	Conservadores
	Filtros solares

En los últimos años, estos compuestos han llamado la atención debido a su uso extensivo y a su potencial efecto negativo en el medio ambiente y la salud del ser humano, de igual forma se sospecha que algunos de ellos son la causa de varios tipos de cáncer y de trastornos hormonales en animales y humanos [Gracia et al., 2012]. Estudios recientes sugieren que estos compuestos químicos no necesitan ser persistentes para causar efectos negativos, ya que debido a su elevado consumo y uso indiscriminado, su presencia en el medio ambiente es constante [You et al, 2015].

Aunado al gran consumo de productos que contienen PPCPs, la presencia de estos en el medio ambiente también se debe en gran parte a su naturaleza polar y/o elevada hidrofiliidad, lo que dificulta el que sean eliminados de las matrices acuosas en las que se encuentran, por lo que sobreviven a los procedimientos de las plantas tratadoras de agua, siendo liberados a través de sus efluentes y pasando así a los organismos vegetales, animales y a los diferentes mantos acuíferos hasta llegar a las plantas potabilizadoras, las cuales también son incapaces de eliminarlos, de tal forma que el ser humano entra nuevamente en contacto con estas sustancias, pero esta vez de manera involuntaria y no con la finalidad para la cual fueron creados [Ellis, 2006; Bu et al., 2013].

Actualmente no existe ninguna legislación internacional o nacional, específica para el control de los residuos de PPCPs. Sin embargo, organismos como la Agencia de Protección del Medio Ambiente en Estados Unidos (EPA), han propuesto diferentes métodos para la determinación de PPCPs en diferentes matrices [EPA 1694, 2007; EPA 1698, 2007].

Los PPCPs han sido encontrados en aguas superficiales, aguas subterráneas, agua potable, aguas de plantas tratadoras de aguas residuales y en biosólidos [McClellan y Halden, 2010; Papageorgiou et al., 2016], además, se ha reportado su presencia en fluidos y tejidos biológicos [Tanoue et al., 2014; Jiménez et al., 2014] en condiciones en las cuales no deberían de encontrarse. Las concentraciones reportadas de estas sustancias van desde niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$ o $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta ng kg^{-1} o ng L^{-1} , dependiendo del tipo de sustancia y la matriz analizada [Teo et al., 2015].

La técnica de preparación de muestra empleada en la eliminación de interferencias y en la preconcentración de los PPCPs ha sido principalmente la extracción en fase sólida [Celano et al., 2014]. Los PPCPs con cierto grado de hidrofobicidad fácilmente pueden ser preconcentrados usando los materiales de fase inversa más comunes de los cartuchos de SPE, siendo el ajuste del pH un factor importante para prevenir la ionización de las moléculas y favorecer su recuperación [Al-Qaim et al., 2014].

Desafortunadamente, dentro de los PPCPs existen una gran cantidad de moléculas con diferentes grados de polaridad, lo que dificulta su extracción con las fases sólidas convencionales, lo que ha llevado a emplear cartuchos con fases mixtas, es decir con interacciones hidrofóbicas - intercambio iónico o más recientemente los materiales con balance hidrofílico - hidrofóbico [Sing Tan et al., 2015]. En general, para compuestos polares, la SPE presenta inconvenientes como: empleo de una gran cantidad de muestra y solventes en la extracción, suelen ser procesos muy laboriosos y arrojan bajas recuperaciones, lo que hace que la técnica no sea tan atractiva para analitos multiclase [Buchberger, 2011].

Por otra parte, actualmente ha surgido la aplicación de las técnicas de microextracción en el análisis de PPCPs, las cuales requieren menos cantidad de muestra y de solventes, además, estos procesos se llevan a cabo en una menor cantidad de tiempo [Pedrouzo et al., 2011]. La SPME [Robles et al., 2013], la extracción en barra adsorbente (SBSE) [Bratkowska et al., 2011; Gilart et al., 2013], la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [Souza et al., 2016] y los QuEChERS [Cerqueira et al., 2014], son técnicas relativamente nuevas que se han utilizado en menor frecuencia en la extracción de PPCPs en muestras medioambientales. Una de las características más importantes de estas técnicas de microextracción, es la obtención de valores elevados de eficiencias de extracción y de factores de enriquecimiento, los cuales pueden aumentar conforme se alcancen las condiciones de equilibrio [Zaitsev y Zui, 2014].

En general las técnicas analíticas empleadas para el rastreo, identificación y/o cuantificación de los PPCPs, son la cromatografía de líquidos (LC) con detectores de UV-Vis y arreglo de diodos (DAD) y, en menor medida, la cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID) y otros detectores [Oliveira et al., 2015].

Además, el análisis de residuos de PPCPs es complicado por la complejidad de la matriz de la muestra y las propiedades físicas y químicas que presentan la gran variedad de compuestos considerados PPCPs, lo que hace que se requieran técnicas altamente sensibles, selectivas y costosas tales como la Cromatografía de Líquidos (LC) y la Cromatografía de Gases (GC) ambas acopladas a la espectrometría de masas (MS). La GC-MS es una técnica robusta y menos costosa, pero la presencia de grupos funcionales polares en algunos de estos compuestos hace necesaria su derivatización para reducir la polaridad y aumentar su volatilidad, lo que genera procedimientos más laboriosos y por consiguiente un mayor consumo de tiempo [Aznar et al., 2016].

Por otro lado, la LC-MS ha permitido el análisis de un mayor número de PPCPs, sin embargo, debido a la diferencia en la polaridad de los PPCPs, los métodos cromatográficos suelen ser por lo general muy largos [Kasprzyk et al., 2008].

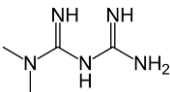
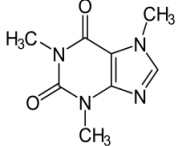
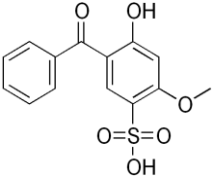
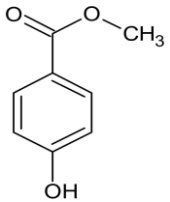
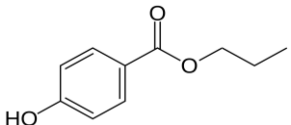
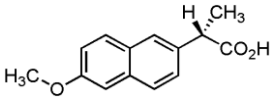
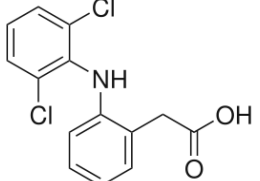
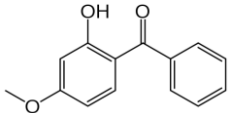
Debido a lo anterior, es necesario introducir métodos rápidos y sensibles que sean capaces de analizar múltiples clases de estos compuestos dentro de una sola corrida analítica y que sean de fácil accesibilidad para la mayoría de los laboratorios de ensayo, por lo que la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detectores de luz ultravioleta-visible y/o arreglo de diodos, se convierte en la técnica más apropiada y conveniente para el análisis de estos contaminantes.

Por otra parte, el desarrollo de un procedimiento analítico que abarque en un solo paso, el análisis de una cantidad considerable de compuestos con diferentes propiedades físicoquímicas como los PPCPs (polaridad, pKa, solubilidad en agua, entre otras), que además, se encuentren en bajas concentraciones, es un proceso bastante complejo [Celano et al., 2014]. En este caso, la preconcentración y la separación de los analitos de posibles interferencias es un paso obligatorio, por lo tanto, la selección y uso adecuado de una técnica de preparación de muestra influye significativamente en la precisión y en la sensibilidad del procedimiento analítico desarrollado y además determina la exactitud de las mediciones obtenidas [Pedrouzo et al., 2011]. Por lo que las ventajas y características del desempeño analítico que presenta la SPME, hacen que se convierta en una alternativa adecuada para el análisis de PPCPs.

1.7 Analitos modelo

Los analitos seleccionados para el desarrollo de este trabajo, pertenecen a distintas clases de PPCPs, dentro de los cuales se incluyen fármacos como la metformina (MET), cafeína (CAF), naproxeno (NAP) y diclofenaco (DIC), conservadores como el metilparabeno (MP) y el propilparabeno (PP) y filtros de radiación ultravioleta como la benzofenona-4 (BP-4) y la benzofenona-3 (BP-3). Estos analitos fueron elegidos de acuerdo a su coeficiente de partición octanol/agua ($\log P$), con la finalidad de cubrir un amplio rango de hidrofiliidad-hidrofobicidad en el cual evaluar la afinidad y desempeño de la fibra que se pretende fabricar. En la Tabla 4, se muestran las estructuras de los analitos modelo, así como su valor de $\log P$ y pK_a .

Tabla 4. Analitos modelo y sus valores de Log P y pKa.

Analito	Estructura	log P	pKa	Ref.
Metformina		- 2.60	2.80 / 11.50	[El-Wasseef, 2012)]
Cafeína		- 0.07	13.90	[You et al., 2015]
Benzofenona-4		0.89	-2.40* / 7.60*	[Pub Chem, 2019]
Metilparabeno		2.00	8.30	[Bratkowska et al., 2011]
Propilparabeno		2.90	8.20	[Bratkowska et al., 2011]
Naproxeno		3.18	4.30	[You et al., 2015]
Diclofenaco		3.70	4.20	[Bratkowska et al., 2011]
Benzofenona-3		4.00	7.60	[Bratkowska et al., 2011]

*Valores calculados con el software Chem Axon de ChemSpider, Royal Soc. Chem.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La SPME ha demostrado ser una técnica rápida, simple y amigable con el medio ambiente y con el analista. Sin embargo, debido al reducido número de fibras comercialmente disponibles adecuadas para procesos de extracción por inmersión directa, resulta necesario la búsqueda de recubrimientos alternativos que permitan ampliar la aplicabilidad de la técnica.

La gran capacidad solvente de los ILs, su baja presión de vapor, su elevada estabilidad térmica y su miscibilidad ajustable, permiten pensar que estos solventes iónicos pueden desempeñarse satisfactoriamente como nuevos recubrimientos para fibras de SPME y aplicarlos en procesos de extracción por inmersión directa para el análisis de analitos en un amplio rango de polaridad.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar una fibra de SPME con recubrimiento basado en ILs y evaluar su aplicación en extracciones por inmersión directa.

3.2 Objetivo específicos

1. Desarrollar y validar un método por HPLC-DAD para el análisis simultáneo de los analitos modelo.
2. Implementar un procedimiento para fabricar una fibra de SPME basada en ILs mediante el método de inmersión - aglutinación.
3. Caracterizar la fibra desarrollada mediante la determinación del espesor, uniformidad, estabilidad y capacidad de extracción del recubrimiento.
4. Establecer un procedimiento de SPME por inmersión directa para la extracción de los analitos modelo incluidos en el estudio.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

4.1.1 Líquido iónico

Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio ([DMIM] [BF₄]), Iolitec, 98 %.

4.1.2 Estándares de PPCPs

Los estándares utilizados fueron adquiridos en Sigma Aldrich:

Benzofenona-3 (2-hidroxí-4-metoxibenzofenona, 98 %)

Benzofenona-4 (ácido 5-benzoil-4-hidroxí-2-metoxi-bencensulfónico, ≥ 97 %)

Cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina, Reagent plus)

Diclofenaco (ácido 2-[(2,6-diclorofenil) amino] bencenacético, 95 %)

Metformina (hidrocloruro de 1,1-dimetilbiguanida, 97 %)

Metilparabeno (metil-4-hidroxibenzoato, ≥ 99 %)

Naproxeno (ácido (S)-2-metoxi-2-naftil) propanoico, USP)

Propilparabeno (propil-4-hidroxibenzoato, ≥ 99 %)

4.1.3 Adhesivos

Cemento amarillo de CPVC, Oatey, USA.

Elastómero de silicón Sylgard 184, Sigma Aldrich, USA.

Elastómero de silicón Sylgard 170, Sigma Aldrich, USA.

Kola Loka Brocha, Kola Loka, México.

Pegamento UHU, UHU, Alemania.

Pegamento Total Tech, Ceys, España.

Resistol epóxico en jeringa, Henkel, México.

Silicón F101Sista, Henkel, USA.

Silicón líquido, Pelikan, México.

4.1.4 Disolventes y otros reactivos

Acetona, J.T. Bkaer, 99 %.

Acetonitrilo, J. T. Baker, grado HPLC.

Ácido clorhídrico, J. T Baker, 36.5 – 38 %.

Ácido fórmico, Merck, 99.8 %.

Ácido nítrico, CTR, 65 %.

Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey.

Agua desionizada, Pure Lab UHQII, Elga II, Veolia.

Diclorometano, Tedia, 99.8 %.

Hexano, Mallinckrodt, 95 %.

Hidróxido de amonio, Sigma-Aldrich, 29 %.

Hidróxido de sodio, Fluka, 98 %.

Metanol, J. T. Baker, grado HPLC.

Tolueno, Sigma-Aldrich, 95 %.

4.2 Equipos

4.2.1 Cromatógrafos

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Serie 1100, equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de columna y detector UV de longitud de onda variable, Hewlett Packard.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, modelo 2695, equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de la columna y detector de arreglo de diodos modelo 2996, Waters.

4.2.2 Equipos en general

Balanza analítica GR-120, AND.

Balanza semianalítica, GX-200, AND.

Baño con recirculador termostatzado Haake B3, Thermo Scientific.

Baño de ultrasonido, Bransonic 3510, Branson.

Bomba de vacío, Modelo SA55NXGTE-4870, Fisher Scientific.

Bomba de doble pistón D-14163, Knauer.

Centrífuga con control de temperatura, IEC Centra CL3, Thermo Scientific.

Espectrofotómetro FT-IR-ATR Modelo Frontier, Perkin Elmer

Estereoscopio Leica 2000M, Leica.

Microscopio digital serie KEYENCE VHX-5000, Keyence.

Microscopio electrónico de barrido TOPCON SM-510, TOPCON.

Placa de calentamiento y agitación magnética, CIMAREC, Thermo Scientific.

Potenciómetro SensION pH, Hach.

Purificador de agua, Pure Lab UHQII, Elga, Veolia.

Vortex Thermolyne Tipo 37600, Barnstead International.

4.3 Materiales

4.3.1 Columnas cromatográficas

Atlantis dC₁₈ (2.1 x 150 mm, 3 µm; Waters)

Discovery HSF5 (2.1 x 150 mm, 3 µm; Supelco)

Eclipse XDB-C₈ (2.1 x 100 mm, 3.5 µm; Agilent)

Kinetex PFP (2.1 x 50 mm, 2.6 µm; Phenomenex)

4.3.2 Materiales de soporte para la fibra de SPME

Alambre de acero inoxidable de 0.012 in de diámetro, American Ortho Tech, USA.

Alambre de acero inoxidable de 0.014 in de diámetro, American Ortho Tech, USA.

Capilar de sílice de 0.53 mm de diámetro, Supelco, USA

4.3.3 Materiales en general

Bulbo para pipeta Pasteur.

Jeringas de plástico de 1 mL, BD.

Matraces de aforación de 5 mL, Pyrex.

Matraces de aforación de 10 mL, Pyrex.

Matraces de aforación de 25 mL, Pyrex.

Matraces de aforación de 50 mL, IVA.

Matraces de aforación de 250 mL, Pyrex.

Membranas de Nylon 47 mm de diámetro, 0.45 μm de poro; Millipore.

Pipeta automática de volumen variable de 100 a 1000 μL , Eppenddorf.

Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL, Pyrex.

Pipetas Pasteur.

Portaobjetos 7.5 cm x 2.5 cm x 0.1 cm; Corning.

Programa Excel 2007, Microsoft.

Reservorios para la fase móvil de 500 mL con tapa rosca, Schott Duran.

Sistema de filtración al vacío de Millipore.

Termómetros -20 °C a 110 °C, Brannan.

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Viales transparentes de 2 mL de tapa de rosca, Agilent.

4.4 Metodología

4.4.1 Desarrollo del método cromatográfico

Para el desarrollo de los métodos cromatográficos se emplearon soluciones estándar de cada uno de los analitos a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas en metanol o acetonitrilo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La detección de los analitos se realizó a diferentes longitudes de onda, de acuerdo al equipo cromatográfico utilizado. En la Tabla 5, se muestran las longitudes de onda seleccionadas para el análisis de cada una de las moléculas estudiadas.

Tabla 5. Longitudes de onda de detección de los analitos modelo.

Analito	HPLC Waters (nm)	HPLC HP (nm)
Metformina	233	233
Cafeína	273	270
Bnezofenona-4	290	
Metilparabeno	257	
Propilparabeno	257	
Naproxeno	232	
Diclofenaco	280	
Benzofenona-3	290	

Las columnas evaluadas durante el desarrollo del método cromatográfico fueron Kinetex PFP (2.1 x 50 mm, 2.6 μm ; Phenomenex), una Atlantis dC₁₈ (2.1 x 150 mm, 3 μm ; Waters) y una Discovery HSF5 (2.1 x 150 mm, 3 μm ; Supelco). Todas las columnas son de fase inversa con diferente tecnología de fabricación y fase estacionaria.

Las fases móviles evaluadas consistieron en mezclas de una solución amortiguadora de ácido fórmico–formiato de amonio (40 mM, pH 4), con metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos. La solución amortiguadora fue preparada con agua desionizada. Todas las fases móviles empleadas en el desarrollo experimental fueron filtradas con membranas de nylon (47 mm de diámetro, 0.45 μm de poro) y colocadas para su degasificación en un baño de ultrasonido por 15 minutos.

El flujo de la fase se estableció considerando su composición y las características de cada columna; evaluándose en un rango de 0.1 – 0.2 mL min⁻¹, en todos los casos la separación se llevó a cabo en modo de gradiente. Los gradientes evaluados consistieron en fases que contenían entre 0 y 95 % de modificador orgánico. Los cambios programados en la composición de las fases móviles se realizaron en diferentes etapas del gradiente y con diferente duración. Las separaciones se llevaron a cabo entre 35 y 50 °C, con volúmenes de inyección entre 3 y 5 μL .

4.4.2 Selección del método cromatográfico óptimo para el análisis de los PPCPs modelo

La selección de las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de las moléculas diana de este trabajo, se llevó a cabo en primera instancia por medio de una inspección visual de los cromatogramas obtenidos en cada una de las condiciones evaluadas en las columnas estudiadas.

También se realizó una selección de los métodos considerando los tiempos de retención (t_R), la forma de los picos y la resolución (R_s) entre las señales cromatográficas contiguas, la cual fue calculada de acuerdo a la *ecuación 1* [Song y Wang, 2003].

$$R_s = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_{bA} + W_{bB}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

R_s = Resolución

$(t_R)_A$ = Tiempo de retención del pico A

$(t_R)_B$ = Tiempo de retención del pico B

W_{bA} = Ancho de la base del pico A

W_{bB} = Ancho de la base del pico B

Otro parámetro que ayudó en la selección de las condiciones fue el factor de retención (k), el cual fue calculado de acuerdo a la *ecuación 2*.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Ecuación 2.

Donde:

k = Factor de retención

t_R = Tiempo de retención del pico cromatográfico

t_M = Tiempo muerto

4.4.3 Validación del sistema cromatográfico seleccionado

El sistema cromatográfico seleccionado se validó considerando las recomendaciones de la EURACHEM [Magnusson y Örnemark, 2014]. Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Para la validación del método se preparó una solución estándar que contenía todos los analitos a una concentración de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol. Para obtener las soluciones estándar de trabajo (de 2 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de 0.5 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), se realizaron diluciones con una mezcla compuesta por solución amortiguadora y metanol (70:30) a partir de la solución estándar inicial.

- **Linealidad**

Se construyeron curvas de calibración por estándar externo en las diferentes etapas del proceso experimental en un rango de concentraciones que iba de 0.5 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, todas por triplicado. Con las áreas de las señales obtenidas en los cromatogramas se construyó el gráfico de concentración contra las respuestas. Como primer paso se realizó una inspección visual de la curva resultante y posteriormente se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta y observar la relación de linealidad mediante los coeficientes de correlación ($r \geq 0.995$) y de determinación ($r^2 \geq 0.995$). Además, se analizó el gráfico de residuales del modelo de regresión y se calcularon los factores de respuesta obtenidos en cada nivel de concentración de la curva de calibración.

- **Precisión**

La precisión fue evaluada mediante el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas, para cada nivel de concentración de los estándares de la curva de calibración, de acuerdo a la *ecuación 2* [Miller y Miller, 2002]. Un porcentaje de $DER < 5 \%$, es indicativo de una buena precisión [Mahdi Moein et al., 2017].

$$\% DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde:

$\% DER$ = Desviación estándar relativa en porcentaje

s = Desviación estándar de las respuestas de cada uno de los estándares

\bar{x} = Promedio de las respuestas

- **Exactitud**

Para la exactitud se evaluó la correlación entre la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real. Para ello se calculó la concentración de los estándares utilizando la ecuación obtenida por la curva de calibración y se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados. Se analizaron los valores de la pendiente y el coeficiente de determinación de las curvas de regresión ajustada, considerando como criterios de aceptación valores de $m \approx 1$ y $r^2 \geq 0.99$ [Swartz y Krul, 2005; Burke, 2001].

- **Límites de detección y de cuantificación**

El límite de detección (LD) se determinó mediante 3.3 veces la relación entre la desviación estándar de las respuestas (s) obtenidas para cada uno de los analitos en las curvas de calibración y la pendiente de la misma curva de calibración (m), considerando la *ecuación 3* y el límite de cuantificación (LC) con 10 veces esta misma relación, como se muestra en la *ecuación 4* [Miller y Miller, 2002]. La desviación estándar de las respuestas (s) se obtuvo de acuerdo a las *ecuaciones 6 y 7* [Miller y Miller, 2002].

$$LD = 3.3 \left(\frac{s}{m} \right) \quad \text{Ecuación 4.}$$

LD = Límite de detección

s = Desviación estándar de la ordenada en el origen

m = Pendiente de la curva de calibración

$$LC = 10 \left(\frac{s}{m} \right) \quad \text{Ecuación 5.}$$

LC = Límite de cuantificación

s = Desviación estándar de la ordenada en el origen

m = Pendiente de la curva de calibración

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 6.}$$

S_a = Desviación estándar de la ordenada al origen.

$S_{y/x}$ = Desviación estándar residual de la recta de regresión.

x = Valor individual de la concentración.

\bar{x} = Promedio de los valores de x .

n = número de observaciones.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Ecuación 7.

$S_{y/x}$ = Desviación estándar residual de la recta de regresión.

y_i = valor individual de la respuesta.

\hat{y}_i = valor del residual de y.

n = número de observaciones.

4.4.4 Fabricación de la fibra de SPME

La fabricación de la fibra se dividió en tres etapas: como primera etapa el desgaste de los soportes metálicos, posteriormente la obtención de una mezcla homogénea de adhesivo – líquido iónico – solvente y por último el recubrimiento del soporte metálico desgastado con la mezcla homogénea obtenida.

4.4.4.1 Desgaste de los alambres de acero inoxidable

Para la fabricación de la fibra de SPME, se evaluaron como soporte dos tipos de alambre de acero inoxidable, uno de 0.012 pulgadas y otro de 0.014 pulgadas de diámetro.

El tratamiento realizado se basó en la metodología propuesta por Cui y colaboradores [Cui et al., 2015], Kag y colaboradores [Kang et al., 2015] y Shi y colaboradores [Shi et al., 2016]. Se cortaron fragmentos de 7 cm de longitud de cada alambre y se desgastaron 3 cm de cada alambre por inmersión en HCl 12 N, HNO₃ 15 N, HCl 5 N y NaOH 5 N. El desgaste de las fibras se realizó a 50 °C por periodos de 10 a 180 min.

En la figura 5 se presenta el montaje del equipo utilizado para el desgaste de los alambres. Después de transcurrido el tiempo de desgaste de cada experimento, los alambres fueron lavados en agua desionizada durante 15 minutos en un baño de ultrasonido.

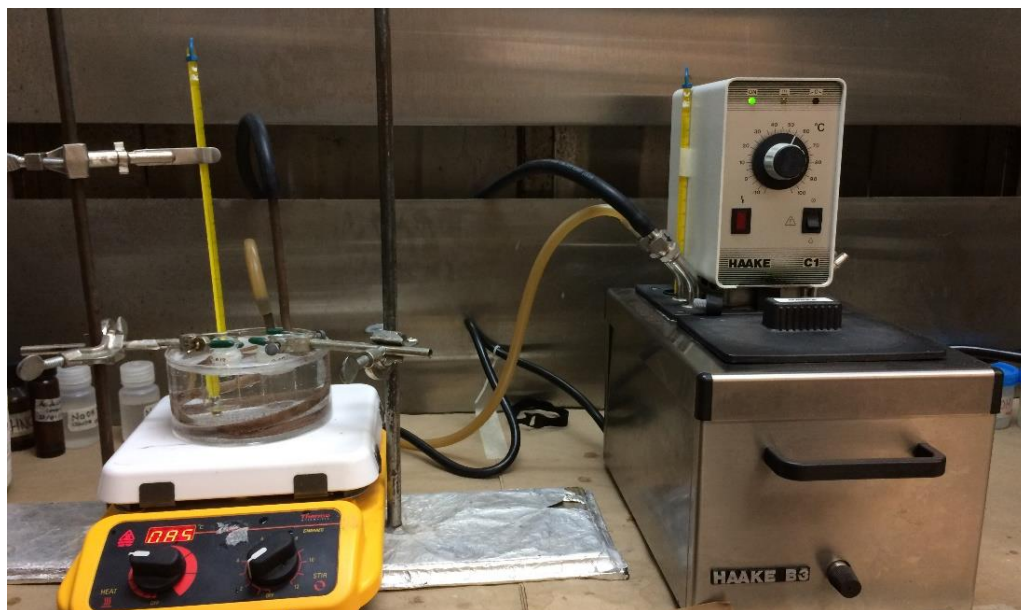


Figura 5. Montaje utilizado para el desgaste de los alambres de acero inoxidable.

La evaluación del proceso de desgaste de los alambres se llevó a cabo con ayuda de un estereoscopio, observando la presencia de rugosidad, porosidad o algún cambio en la morfología de la superficie de los alambres tratados.

4.4.4.2 Selección del adhesivo para formar la mezcla de recubrimiento

Como primer punto, se evaluó la solubilidad de los adhesivos en diclorometano, acetona, tolueno y hexano. En la Tabla 6, se muestran las cantidades de adhesivo y de solvente utilizadas en cada una de las pruebas, las mezclas evaluadas fueron agitadas en vórtex durante 1 min, en todos los casos la inspección de las pruebas fue visual.

Tabla 6. Mezclas evaluadas en las pruebas de solubilidad del adhesivo.

Composición	
Adhesivo (g)	Disolvente (mL)
1	1
1	0.75
1	0.5
1	0.25

Por otra parte, se evaluó la capacidad de formar una mezcla homogénea entre el adhesivo y el líquido iónico. Para estos ensayos se mezcló 0.1 g de los diferentes adhesivos con 0.1 mL de líquido iónico. Todas las mezclas fueron agitadas durante 1 min en vórtex y su evaluación fue visual.

4.4.4.3 Recubrimiento de los alambres desgastados

El recubrimiento de las fibras se realizó por el método de inmersión – aglutinación [He et al., 2009; Huang et al., 2009 y Ho et al., 2012].

Una longitud de aproximadamente 1.4 cm de alambre desgastado se sumergió en las mezclas homogéneas de adhesivo y líquido iónico. Para determinar la cantidad apropiada de ciclos de inmersión se evaluaron las siguientes combinaciones: 1 inmersión por 1 min, 3 inmersiones por 30 segundos cada una y 3 inmersiones de 1 min cada una.

4.4.4.4 Recubrimiento de los fragmentos de sílice

Para la fabricación de la fibra de SPME, también evaluó el uso de fragmentos de fibras de sílice (diámetro de 0.53 mm) como soporte.

Los fragmentos de sílice utilizados fueron de 7 cm de largo, a los cuales, por medio de calentamiento con flama y posterior lavado con acetona, se les eliminó la cubierta de poliamida [Amini et al., 2011].

Los fragmentos de sílice utilizados fueron divididos en dos grupos, uno sin tratamiento y otro con tratamiento, el tratamiento consistió en sumergir las fibras de sílice en NaOH 1 N durante 3 horas.

El recubrimiento de los fragmentos de sílice se llevó a cabo de la misma manera como se realizó el recubrimiento de los alambres desgastados, como lo indica el apartado 4.4.4.3.

4.4.5 Caracterización de la fibra de SPME

Para la caracterización de la fibra desarrollada se consideraron los siguientes parámetros:

4.4.5.1 Uniformidad del recubrimiento

Para la evaluación de la uniformidad de la fibra primeramente se realizó una observación visual de los recubrimientos formados para detectar la presencia de escurrimientos y formación de grumos o gotas de las mezclas de recubrimiento, descartando aquellos que no presentaron una película uniforme.

Posteriormente las fibras que en la inspección visual presentaron uniformidad, se observaron en un microscopio óptico y en un microscopio electrónico de barrido, analizando la uniformidad del recubrimiento de la fase extractante formada.

4.4.5.2 Espesor del recubrimiento

El espesor de la película de fase extractante inmovilizada sobre el soporte de acero inoxidable se obtuvo por la medida directa del grosor del material orgánico depositado sobre los alambres desgastados. La medición se realizó mediante microscopía electrónica de barrido, previamente las muestras fueron fijadas en resina y recubiertas con oro-paladio.

4.4.5.3 Selección del recubrimiento de la fibra de SPME

La selección de la nueva fase extractante para la fibra de SPME, se llevó a cabo considerando la uniformidad del recubrimiento sobre el soporte metálico. Seleccionando aquel recubrimiento que presentó la mayor uniforme posible.

4.4.5.4 Caracterización del recubrimiento seleccionado por Espectrofotometría de Infrarrojo (IR)

Para caracterizar el recubrimiento, se analizaron el líquido iónico puro (DMIM-BF₄), el adhesivo puro (UHU) y la fibra recubierta por espectrofotometría de IR.

Los espectros fueron registrados con un espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR-ATR Modelo Frontier de Perkin Elmer. Antes de cada análisis el diamante del ATR se limpió y se realizó el registro de la señal de fondo del aire. Los espectros se obtuvieron en un intervalo de número de onda de 550 a 4000 cm⁻¹ con 20 escaneos.

4.4.5.5. Análisis elemental del soporte metálico antes y después del recubrimiento seleccionado

El soporte de la fibra (alambre desgastado) fue observado bajo el microscopio electrónico de barrido antes y después de ser recubierto con las mezclas de adhesivo más líquido iónico. Utilizando el detector de energía dispersiva (EDS), se colectaron

los espectros de Rayos X generados por la muestra y se obtuvo el análisis elemental de la misma.

4.4.5.6 Estabilidad del recubrimiento seleccionado frente a distintos disolventes y soluciones con diferentes valores de pH

Previo a las pruebas de estabilidad, para una mejor manipulación de las fibras fabricadas estas fueron montadas en una jeringa de 1 mL, como se puede ver en la imagen de la Figura 6. Para evaluar la estabilidad del recubrimiento, se realizaron pruebas de inmersión de la fibra desarrollada (1 cm aproximadamente) en 200 μ L de agua y en soluciones compuestas por agua-metanol o agua-acetonitrilo a proporciones de 95:5, 90:10, 85:15 y 80:20, respectivamente, durante 30 min a temperatura ambiente. Para evaluar el efecto del pH, se realizaron inmersiones de la fibra en soluciones amortiguadoras de pH 3 y 9 durante 30 min a temperatura ambiente.

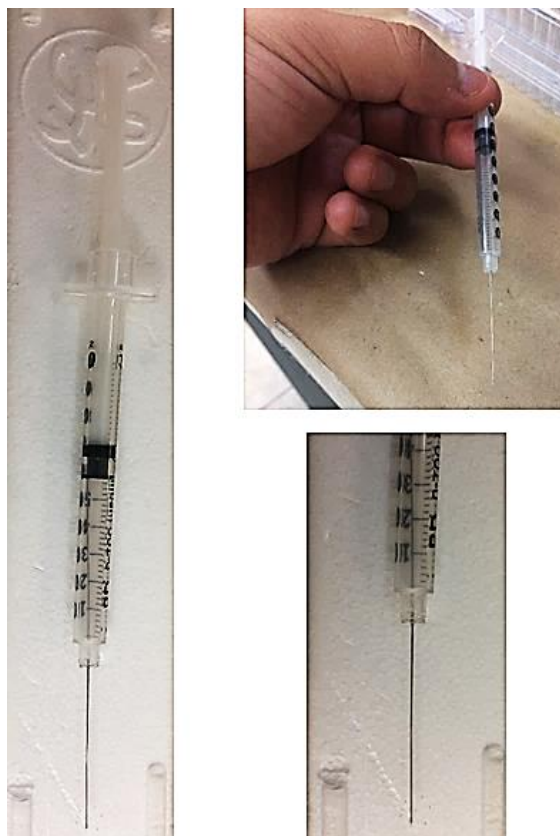


Figura 6. Montaje de la fibra fabricada en una jeringa de 1 mL.

Después de realizar las pruebas, las fibras fueron observadas con ayuda de un estereoscopio para evaluar la integridad o la pérdida de la fase extractante.

Las soluciones de las pruebas de inmersión en agua, agua-metanol y agua-acetonitrilo, fueron inyectadas en el HPLC Waters. El análisis se realizó utilizando una columna Eclipse XDB-C₈, empleando como fase móvil una mezcla de una solución amortiguadora de formiatos 100 mM, pH 4 y metanol o acetonitrilo en gradiente, el cual se muestra en la Tabla 7. El flujo utilizado fue de 0.15 mL min⁻¹, inyectando 20 µL de cada solución y la detección se llevó a cabo a 230 nm [Paul et al., 2005]. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Mientras que las soluciones de las pruebas de inmersión de la fibra en las soluciones de pH 3 y pH 9, fueron inyectadas en el HPLC HP. El análisis se realizó utilizando una columna Eclipse XDB-C₁₈, empleando como fase móvil una mezcla de una solución amortiguadora de formiatos 100 mM, pH 4 y metanol en gradiente, el cual se muestra en la Tabla 8. El flujo utilizado fue de 0.25 mL min⁻¹, inyectando 30 µL de cada solución y la detección se llevó a cabo a 220 nm [Paul et al., 2005]. Las soluciones finales de inyección se ajustaron a una proporción 60 % de metanol y 40 % de solución de inmersión de pH 3 o pH 9. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 7. Gradiente utilizado en el sistema cromatográfico para los estudios de estabilidad del recubrimiento de la fibra en mezclas de disolventes.

Gradiente	
Tiempo (min)	% Metanol
0	10
13	10
14	100
24	100
25	10
60	10

Tabla 8. Gradiente utilizado en el sistema cromatográfico para los estudios de estabilidad del recubrimiento de la fibra en soluciones con diferentes valores de pH.

Gradiente	
Tiempo (min)	% Metanol
0	60
10	60
15	100
23	100
25	60
30	60

4.4.5.7 Capacidad de extracción del recubrimiento seleccionado

Se llevaron a cabo extracciones con la fibra propuesta recubierta con la mezcla de líquido iónico y pegamento, utilizando alícuotas de 5 mL de una solución estándar de los analitos en mezcla a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente y en agitación a 800 rpm. La desorción se llevó a cabo por inmersión de la fibra en 200 μL de una mezcla formada por agua y metanol a una proporción de 80:20 durante 30 min sin agitación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se evaluó el número de señales y el área de los picos cromatográficos de los analitos extraídos después de la inyección de las soluciones de desorción en el equipo de HPLC bajo las condiciones del método cromatográfico previamente validado. De la misma manera se realizaron extracciones utilizando la misma fibra propuesta recubierta solo con el pegamento.

4.4.6 Evaluación de la competencia de los analitos hacia la fibra

Se realizaron extracciones utilizando alícuotas de 5 mL de una solución estándar de los analitos individuales a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando como extractante la fibra propuesta recubierta con la mezcla de líquido iónico y pegamento. Las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente y en agitación a 800 rpm. La desorción se llevó a cabo por la inmersión de la fibra en 200 μL de una mezcla formada por agua y metanol a una proporción de 80:20 durante 30 min sin agitación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4.7 Desempeño de la fibra en extracciones consecutivas

Se realizaron extracciones utilizando alícuotas de 5 mL de soluciones estándar de los analitos (MP, PP, NAP, DIC y BP-3) en mezcla a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, la fibra propuesta recubierta con la mezcla de líquido iónico y pegamento. Se llevaron a cabo tres extracciones consecutivas con la misma fibra, identificadas como Fibra A, B y C. Las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente y en agitación a 800 rpm. La desorción se llevó a cabo por la inmersión de la fibra en 200 μL de una mezcla formada por agua y metanol a una proporción de 80:20 durante 30 min sin agitación.

4.4.8 Establecimiento del método de extracción de los analitos modelo por SPME en modalidad de inmersión directa

En esta parte se empleó un diseño de experimentos para determinar la significancia estadística y efecto de cada una de los factores que intervienen en el proceso de la SPME por inmersión directa.

4.4.8.1 Optimización de la extracción

Como primer paso se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} aleatorizado con 4 puntos centrales, con el objetivo de rastrear los factores más importantes que afectan la extracción de los analitos diana y poder obtener la mayor eficiencia en la extracción de dichos compuestos. Las variables incluídas fueron el tiempo de extracción, temperatura, agitación, fuerza iónica (cantidad de sal) y tipo de sal.

Los factores anteriormente mencionados se evaluaron a dos niveles codificados como valor alto (+) y valor bajo (-), para las variables continuas y a dos niveles (1 y 2) para las variables categóricas, como se muestra en la Tabla 9. Se realizaron un total de 20 experimentos que se presentan en la Tabla 10, el diseño de experimentos fue asistido con el programa Statgraphics Centurion XVII.

Tabla 9. Variables incluidas en el diseño de experimentos de la extracción.

Factor	Unidades	Valor (+)	Valor (-)	Nivel 1	Nivel 2
Tiempo	minutos	45	15	-	-
Temperatura	°C	40	Temperatura de laboratorio	-	-
Agitación	rpm	800	0	-	-
Fuerza iónica	% p/v	10	0	-	-
Tipos de sal	-	-	-	NaCl	Na ₂ CO ₃

Tabla 10. Diseño de experimentos de la extracción.

Experimento	Tiempo	Temperatura	Agitación	Fuerza iónica	Tipo de sal
1	45	25	800	0	0
2	15	25	0	0	0
3	15	40	800	10	1
4	45	40	800	10	2
5	45	25	800	10	1
6	15	40	0	10	2
7	30	32.5	400	5	1
8	45	40	800	0	0
9	15	40	0	0	0
10	15	25	0	10	1
11	15	25	800	0	0
12	30	32.5	400	5	2
13	15	40	800	0	0
14	30	32.5	400	5	2
15	45	25	0	10	2
16	45	25	0	0	0
17	45	40	0	10	1
18	15	25	800	10	2
19	30	32.5	400	5	1
20	45	40	0	0	0

Todos los experimentos se realizaron con 8 mL de soluciones estándar acuosas de los PPCPs modelo a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y las condiciones de desorción se mantuvieron constantes en todos los experimentos, utilizando un volumen de 0.3 mL de una mezcla de agua y metanol a una proporción de 80:20, respectivamente, durante 30 min.

Para evaluar el efecto y la significancia de los factores en la extracción de los analitos, se construyeron los gráficos de coeficiente escalados y centrados a partir de las áreas obtenidas de los picos cromatográficos en las diferentes condiciones experimentales, con ayuda del programa Modde 12.2.

De igual manera empleando dicho programa, se construyeron modelos de predicción para encontrar el impacto que tienen sobre las respuestas a los niveles estudiados los factores que se encontraron afectan significativamente la extracción, mediante la construcción de gráficos de contorno.

Una vez obtenidos los valores de los factores en los cuales se espera una mayor respuesta, estos se optimizaron por medio de un diseño de factor por factor, para poder seleccionar las condiciones óptimas de extracción.

4.4.8.2 Optimización de la desorción

Para este propósito, de forma inicial se aplicó un diseño factorial completo 2^3 aleatorizado sin puntos centrales, con el objetivo de rastrear los factores más importantes que afectan la desorción de los analitos y poder obtener la mayor eficiencia en su extracción. Los factores evaluados fueron el tipo de disolvente, proporción de disolvente y el tiempo de desorción, el volumen de desorción se fijó a 300 μL , ya que es el volumen que cubre toda la fase extractante. Los factores anteriormente mencionados se evaluaron a dos niveles codificados como valor alto (+) y valor bajo (-), para las variables continuas y a dos niveles (1 y 2) para las variables categóricas, como se muestra en la Tabla 11, realizando un total de 8 experimentos (Tabla 12), el diseño de los experimentos fue asistido con el programa Statgraphics Centurion XVII.

Tabla 11. Variables incluidas en el diseño de experimentos de la desorción.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Valor (+)	Valor (-)
Tipo de disolvente	Agua/Metanol	Buffer/Metanol	-	-
Proporción de disolvente	80/20	70/30	-	-
Tiempo	-	-	30	10
Volumen de desorción	300 μL			

Tabla 12. Diseño de experimentos de la desorción.

Experimento	Tipo de disolvente	Proporción de disolvente	Tiempo
1	2	2	30
2	2	1	30
3	2	1	10
4	1	2	10
5	1	1	10
6	1	2	30
7	2	2	10
8	1	1	30

Todos los experimentos se realizaron con 8 mL de soluciones estándar acuosas de los PPCPs modelo a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y las condiciones de extracción fueron las obtenidas como óptimas de acuerdo al apartado anterior (4.4.6.1), las cuales fueron temperatura de laboratorio ($21 - 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$), agitación a 800 rpm, sin adición de sal, durante 15 minutos y sumergiendo 2 cm de la fibra.

Para evaluar el efecto y la significancia de los factores en la desorción de los analitos, se construyeron los gráficos de coeficiente escalados y centrados a partir de las áreas obtenidas de los picos cromatográficos en las diferentes condiciones experimentales, con ayuda del programa Modde 12.2.

De igual manera empleando dicho programa, se construyeron modelos de predicción para encontrar el impacto que tienen sobre las respuestas a los niveles estudiados los factores que se encontraron afectan significativamente la desorción, mediante la construcción de gráficos de contorno.

Una vez obtenidos los valores de los factores en los cuales se espera una mayor respuesta, estos se optimizaron por medio de un diseño de factor por factor, para poder seleccionar las condiciones óptimas de desorción.

4.4.9 Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción de diferentes fibras bajo las condiciones óptimas establecidas

Con el fin de evaluar la reproducibilidad a través de la eficiencia de extracción de la fibra con el recubrimiento propuesto, se realizaron extracciones fibra a fibra dentro de un mismo lote y entre fibras de diferente lote; para ello se fabricaron 6 lotes constituidos por 3 fibras cada uno.

Las extracciones se llevaron a cabo bajo las condiciones óptimas de extracción y desorción. Las extracciones se realizaron a soluciones acuosas estándar de 0.5, 1.5 y 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de las mezclas de PPCPs. De tal forma que: las Fibras del Lote 1, 2 y 3 se utilizaron en la extracción de las soluciones de concentración baja, intermedia y alta, respectivamente; mientras que cada una de las fibras de los Lotes 4, 5 y 6, fueron empleadas para la extracción de cada una de las soluciones de las concentraciones antes mencionadas. La comparación de la eficiencia de extracción se hizo en base a las áreas de los picos cromatográficos obtenidos de los analitos en cada una de las extracciones. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de un análisis de varianzas (ANOVA) de un factor. Mientras que la reproducibilidad se evaluó por medio del porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas obtenidas en cada fibra.

4.4.10 Validación del método de SPME por inmersión directa

Para validar el método desarrollado, una serie de parámetros que incluyeron linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación fueron investigados.

Para cumplir con este objetivo, se construyeron curvas de calibración a 5 niveles de concentración, los cuales estuvieron conformados por la mezcla estándar de analitos a concentraciones de 0.5, 2.5, 5.0, 10 y 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MP, PP, NAP, DIC y BP-3 por triplicado. Los estándares de cada curva fueron sometidos al proceso de extracción y desorción bajo las condiciones óptimas previamente establecidas y 5 μL de las soluciones de desorción fueron inyectadas al cromatógrafo de líquidos para obtener las áreas de los picos cromatográficos correspondientes y construir las curvas de calibración.

Los parámetros evaluados se estudiaron de acuerdo a lo establecido en el apartado 4.4.3.

4.4.11 Aplicabilidad del método

La viabilidad práctica del método propuesto para determinar los PPCPs (MP, PP, NAP, DIC y BP-3) en muestras reales, se evaluó mediante el análisis de diferentes muestras de agua potable fortificadas a un nivel de $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la extracción se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas del método de SPME por inmersión directa.

4.4.11.1 Recolección de las muestras

Tres muestras de agua fueron obtenidas de reservorios de agua tipo cisterna del sistema de abastecimiento de agua potable del municipio de Monterrey (Nuevo León, México), las cuales fueron identificadas como M1, M2 y M3. De igual manera, siete muestras de agua de grifo fueron obtenidas del sistema de abastecimiento de agua potable de los municipios de San Nicolás de los Garza (M4), Guadalupe (M5), Apodaca (M6), Monterrey (M7), Escobedo (M8), García (M9) y Santa Catarina (M10), todos los municipios pertenecientes a la Zona Metropolitana de Monterrey en el estado de Nuevo León, México.

Todas las muestras fueron refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Antes de la extracción, las muestras se llevaron a temperatura de laboratorio y se filtraron por gravedad a través de papel de filtro de celulosa de 125 mm de diámetro, grado 2 (Whatman, U.K.). Se analizó una muestra blanco y las muestras adicionadas se analizaron triplicado.

4.4.11.2 Análisis de las muestras

Para demostrar la aplicabilidad del método se evaluaron la exactitud y precisión de la determinación de los PPCPs (MP, PP, NAP, DIC y BP-3) en las 10 muestras recolectadas con anterioridad.

Todas las muestra de agua fueron adicionadas a $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentración de cada uno de los analitos, todo el proceso de SPME por inmersión directa se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas de extracción y desorción previamente establecidas en este trabajo.

Para la exactitud se determinó el porcentaje de recuperación (% R), que se calculó utilizando la *ecuación 8* [Harvey, 2000].

$$\% R = \left(\frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración esperada}} \right) 100 \quad \text{Ecuación 8.}$$

La precisión se evaluó con el % DER de las concentraciones obtenidas de cada uno de los analitos extraídos, utilizando la *ecuación 3*.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Desarrollo del método cromatográfico

5.1.1 Métodos desarrollados empleando la columna Kinetex PFP

Para la separación cromatográfica de los analitos modelo se utilizó el cromatógrafo Waters 2695. Se probó la columna Kinetex PFP empelando como fase móvil una solución amortiguadora de formiatos 40 mM (pH 4) y metanol, el cuál se probó en proporciones de 1 y 10 %. Sin embargo, como se observa en la Figura 7 no fue posible la retención de la metformina.

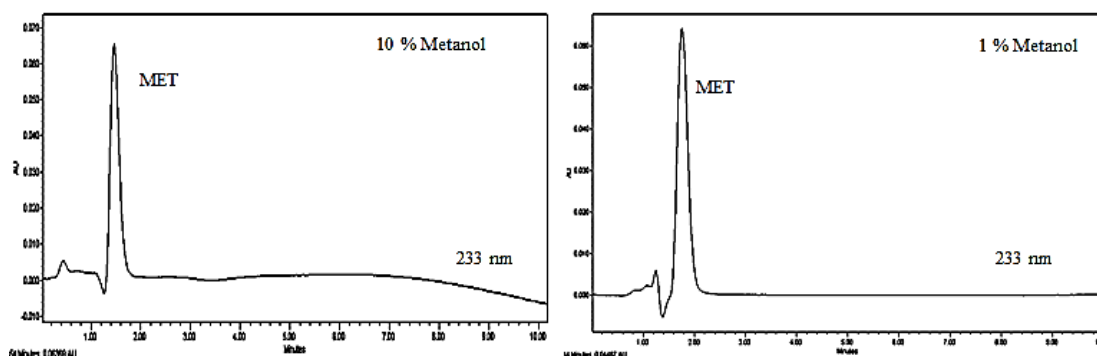


Figura 7. Cromatogramas obtenidos para un estándar de Metformina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Columna Kinetex PFP, flujo de 0.15 mL min^{-1} , 35°C y fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH } 4$) y metanol (10 y 1%).

Posteriormente se probó acetonitrilo como modificador orgánico, las condiciones de flujo, temperatura de columna y volumen de inyección fueron las mismas que se utilizaron con el metanol en los ensayos descritos anteriormente para esta columna. La Figura 8, representa un cromatograma obtenido bajo las condiciones antes mencionadas y en la Tabla 13 se presenta el gradiente utilizado.

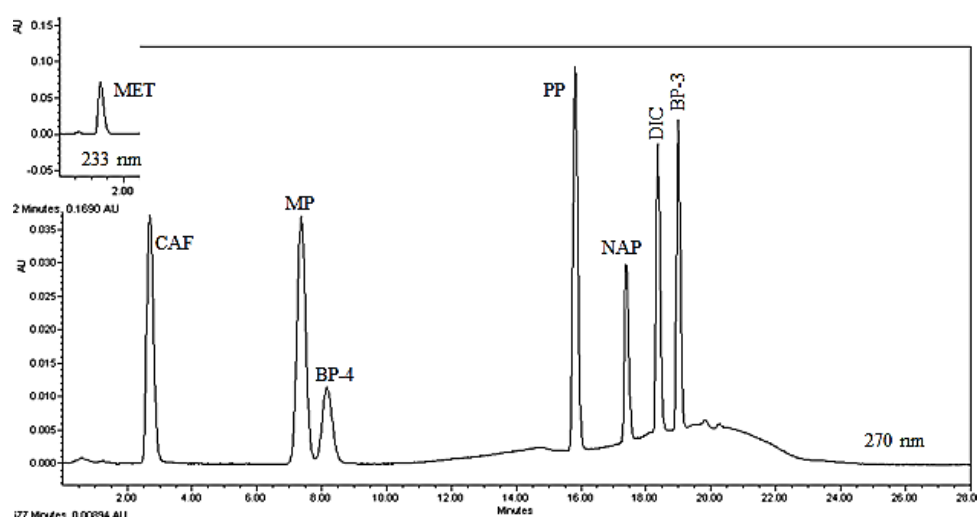


Figura 8. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) bajo las condiciones de la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones seleccionadas para el análisis de PPCPs en la columna

Kinetex PFP.

Condiciones	
Fujo	0.15 mL min ¹
Temperatura	35 °C
Gradiente	
t (min)	% Acetonitrilo
0	10
4	10
8	30
10	30
12	60
15	60
16	10
28	10

5.1.2 Métodos desarrollados empleando la columna Atlantis dC₁₈

Igual que con la columna Kinetex PFP, con la columna Atlantis dC₁₈ se probaron diferentes modificadores orgánicos, flujos y temperaturas de columna; utilizando el cromatógrafo HP 1100.

En este caso, el uso de 1 % de acetonitrilo como modificador orgánico no permitió retener de forma eficiente a la metformina como lo muestra la Figura 9, por lo que este modificador fue descartado.

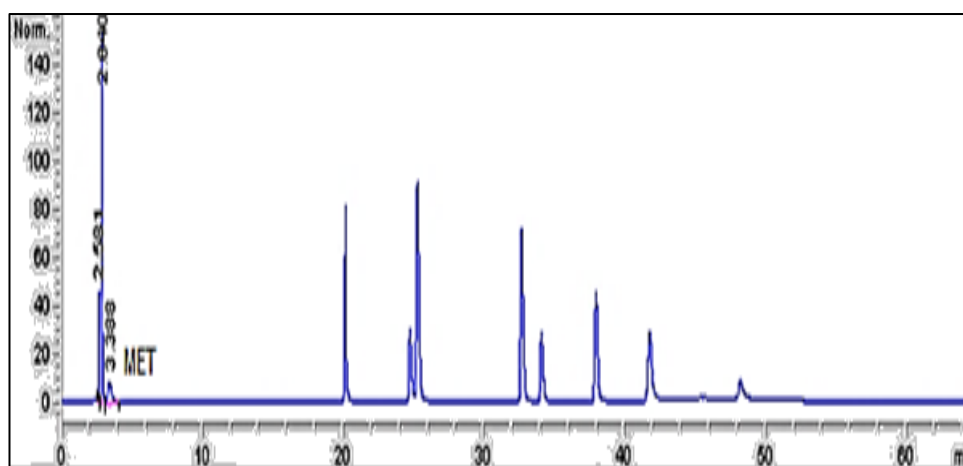


Figura 9. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Columna Atlantis dC₁₈, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 40°C y gradiente inicial de 1 % de acetonitrilo.

Empleando como fase móvil las mezclas de solución amortiguadora y metanol como modificador orgánico, se proban diferentes gradientes y flujos de la fase móvil (0.15 y 0.2 mL min⁻¹). En la Figura 10 se muestra un cromatograma de la mejor separación conseguida con dicha columna bajo las condiciones descritas en la Tabla 14.

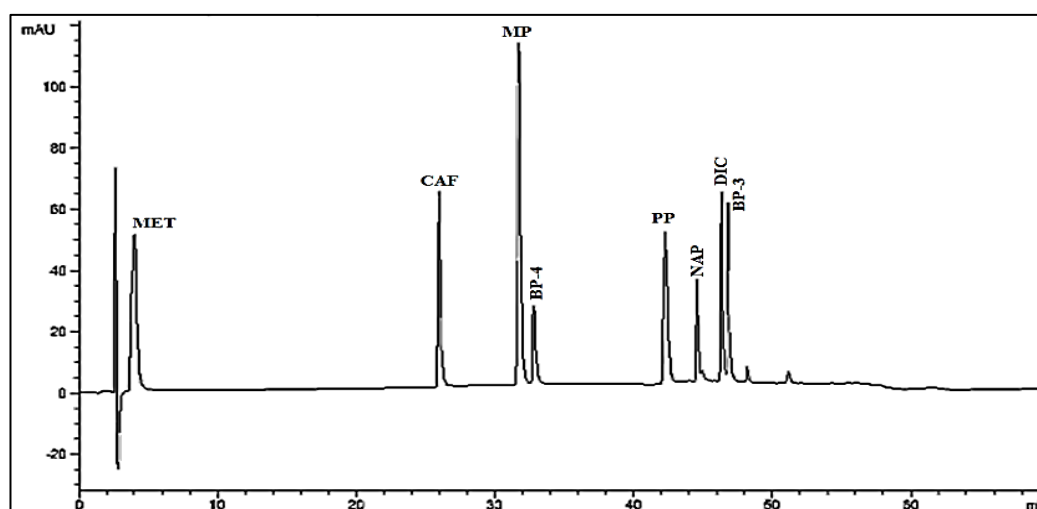


Figura 10. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs (10 µg mL⁻¹) bajo las condiciones de la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones seleccionadas para el análisis de PPCPs en la columna
Atlantis dC₁₈.

Condiciones	
Flujo	0.2 mL min ⁻¹
Temperatura	40 °C
Gradiente	
t (min)	% Metanol
0	1
5	1
30	50
35	50
40	90
45	90
50	1
70	1

En el apartado 10.1 del Capítulo 10 (Anexos), se muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos bajo las distintas condiciones evaluadas en esta columna (Figuras 1A – 1D). Dichas pruebas se llevaron a cabo con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para la separación de los ocho PPCPs estudiados en este trabajo.

5.1.3 Métodos desarrollados empleando la columna Discovery HSF5

Las condiciones cromatográficas de partida se basaron en las reportadas por Garza Tapia y colaboradores [Garza Tapia et al., 2013] para la separación simultánea de algunos fármacos hidrofílicos.

En esta columna, inicialmente se utilizó metanol como modificador orgánico y se trabajó en el cromatógrafo HP 1100. Las condiciones iniciales fueron un flujo de 0.2 mL min⁻¹, temperatura de columna de 45 °C y un volumen de inyección de 3 µL de la mezcla de los estándares. Se probaron distintos gradientes, la Figura 11 es un ejemplo de un cromatograma obtenido bajo las condiciones en las cuales se obtuvo la mejor separación de los analitos estudiados y la Tabla 15 describe dichas condiciones. En este sistema la detección fue a 233 nm del min 0 al 7 y a 270 nm el resto del tiempo de análisis.

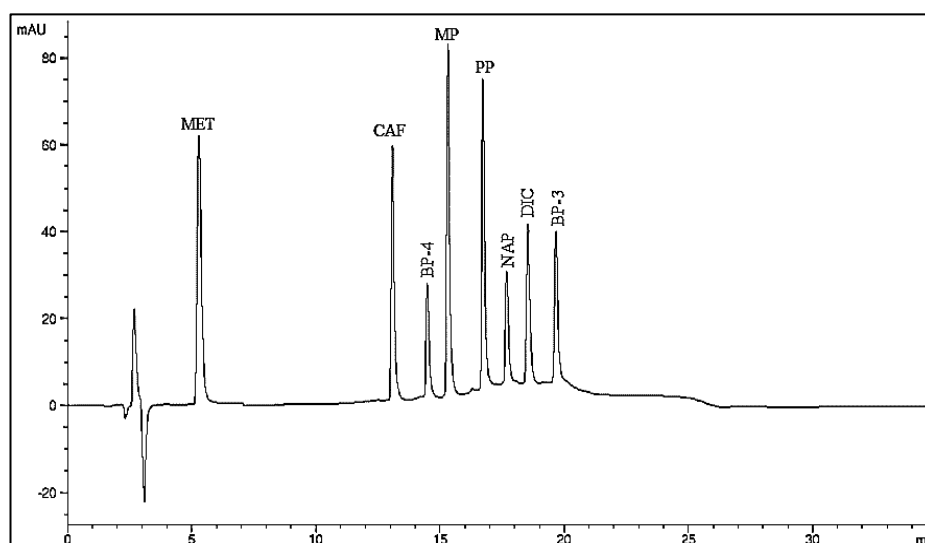


Figura 11. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs (10 µg mL⁻¹) bajo las condiciones de la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones seleccionadas para el análisis de PPCPs en la columna
Discovery HSF5.

Condiciones	
Flujo	0.2 mL min ⁻¹
Temperatura	45 °C
Gradiente	
t (min)	% Metanol
0	5
10	85
18	85
20	5
35	5

Se trasladaron las condiciones de análisis al cromatógrafo Waters 2695 y la Figura 12 es un cromatograma obtenido bajo las condiciones evaluadas.

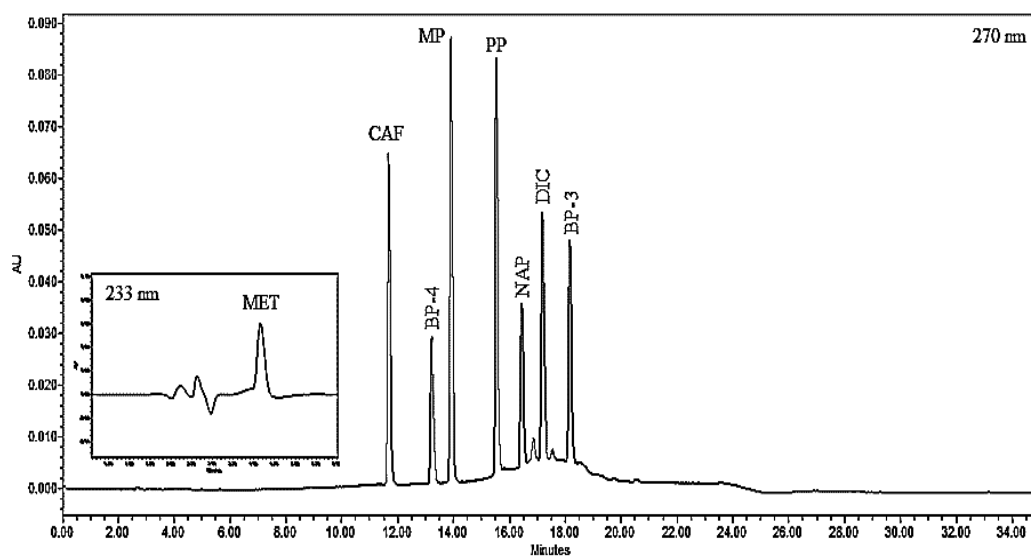


Figura 12. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs (10 µg mL⁻¹) en
cromatógrafo Waters 2695 bajo las condiciones de la Tabla 15.

En el apartado 10.2 del Capítulo 10 (Anexos), se muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos bajo las distintas condiciones evaluadas en esta columna (Figuras 2A – 2E). Dichas pruebas se llevaron a cabo con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para la separación de los ocho PPCPs estudiados en este trabajo.

5.2 Selección del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de los PPCPs modelo.

Bajo las condiciones seleccionadas como adecuadas para el análisis de los PPCPs en cada una de las columnas estudiadas se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 16, en donde se presentan los tiempos de retención de todos los analitos, así como también se muestra los resultados obtenidos en cuanto a la resolución de los analitos contiguos y al factor de retención de todos ellos.

Tabla 16. Parámetros cromatográficos obtenidos para la separación de los PPCPs modelo utilizando los métodos cromatográficos desarrollados en las columnas Kinetex PFP, Atlantis dC18 y Discovery HSF5.

Analyte	Kinetex PFP			Atlantis dC18			Discovery HS F5		
	t_R (min)	R_s	k	t_R (min)	R_s	k	t_R (min)	R_s	k
MET	1.271	—	0.81	04.057	—	0.27	05.293	—	0.9
CAF	2.792	2.48	2.98	26.057	23.91	7.14	13.092	13.93	3.70
BP-4	8.351	0.94	10.93	32.850	1.36	9.27	14.497	2.82	4.20
MP	7.482	6.61	9.68	31.790	7.21	8.93	15.322	1.68	4.50
PP	15.861	10.75	21.65	42.357	12.21	12.24	16.723	2.80	5.00
NAP	17.400	3.01	23.85	44.603	3.45	12.94	17.688	2.14	5.35
DIC	18.375	2.71	25.25	46.380	4.15	13.49	18.544	1.91	5.66
BP-3	19.019	1.65	26.17	46.810	0.93	13.63	19.669	2.39	6.10

De acuerdo a los valores de resolución y factores de retención de los analitos en las diferentes columnas, el sistema cromatográfico seleccionado como óptimo para la separación de los PPCPs estudiados en este trabajo fue el desarrollado con la columna Discovery HSF5 cuyas condiciones se describen en la Tabla 17 y la Figura 13 es un cromatograma obtenido a partir de una solución estándar de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los PPCPs bajo las condiciones óptimas de análisis.

Tabla 17. Condiciones cromatográficas óptimas seleccionadas para el análisis de los PPCPs en el cromatógrafo Waters 2695.

Columna	Discovery HSF5 (2.1 x 150 mm, 3 μm ; Supelco)	
Fase Móvil	Solución amortiguadora de formiatos 40 mM (pH 4)	
	Metanol	
Gradiente	t (min)	% Metanol
	0	5
	10	85
	18	85
	20	5
	35	5
Flujo	0.2 mL min ⁻¹	
Temp. columna	45 °C	
Vol. inyección	3 μL	

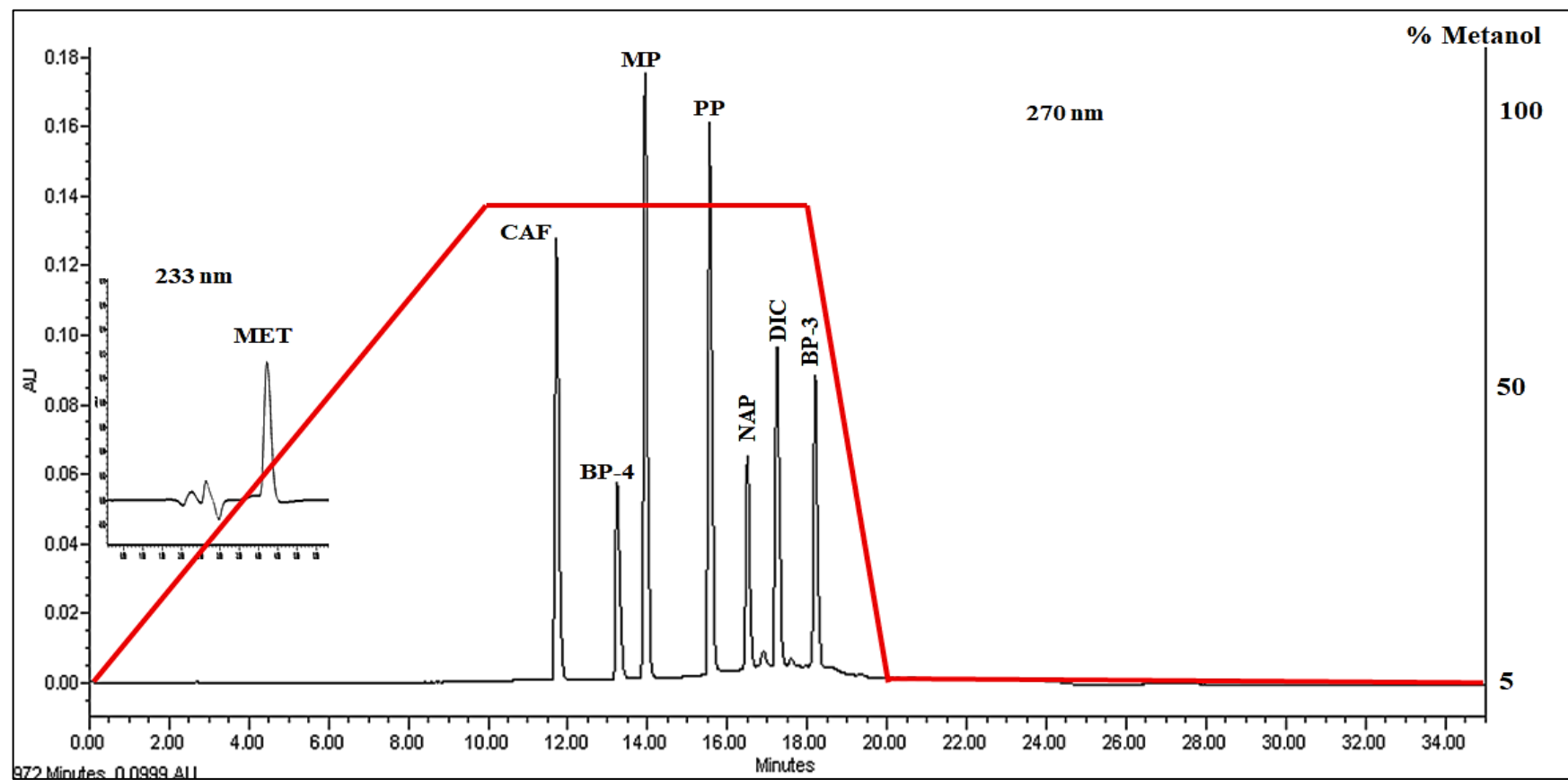


Figura 13. Cromatograma obtenido para una solución estándar de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en buffer de formiatos 40 mM (pH4) y metanol (70:30) bajo las condiciones de la Tabla 17.

5.3 Validación del sistema cromatográfico

El sistema cromatográfico seleccionado como óptimo para la separación de los PPCPs modelo fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, los resultados se presentan en las Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la validación del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de los ocho PPCPs.

Analito	Linealidad			Precisión % DER de las respuestas	Exactitud	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Ecuación de regresión	r^2	% DER de los factores de respuesta				
MET 233 nm	$y = 71303x - 38659$	0.999	2.537	1.03 – 4.11	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.430	1.291
CAF 273 nm	$y = 46205x - 2201.2$	0.999	1.315	0.30 – 1.56	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.293	0.880
PB-4 290 nm	$y = 37934x - 8482$	0.999	2.420	0.31 – 3.68	$m = 0.999$ $r^2 = 0.999$	0.416	1.248
MP 257 nm	$y = 96621x - 14259$	0.999	1.537	0.79 – 2.60	$m = 0.999$ $r^2 = 0.999$	0.302	0.907
PP 257 nm	$y = 84314x - 7203.6$	0.999	2.044	0.93– 3.55	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.326	0.979
NAP 232 nm	$y = 247987x + 210550$	0.998	4.715	0.31 – 1.05	$m = 0.999$ $r^2 = 0.998$	0.514	1.558
DIC 280 nm	$y = 36529x - 11300$	0.999	1.784	0.37 – 2.05	$m = 0.999$ $r^2 = 0.999$	0.476	1.429
BP-3 290 nm	$y = 58167x - 12240$	0.999	1.393	0.71 – 1.74	$m = 0.999$ $r^2 = 0.999$	0.312	0.937

5.4 Fabricación de la fibra de SPME

5.4.1 Desgaste de los alambres de acero inoxidable.

Los soportes metálicos fueron desgastados con HCl 12 N, HNO₃ 15 N, NaOH 5 N y HCl 5 N, durante periodos de tiempo de 10 a 180 min y a una temperatura constante de 50°C.

En la Figura 14, se muestra una fotografía de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HNO₃ 15 N, en ninguno de los casos se observó desgaste aparente al ser observadas bajo el estereoscopio.

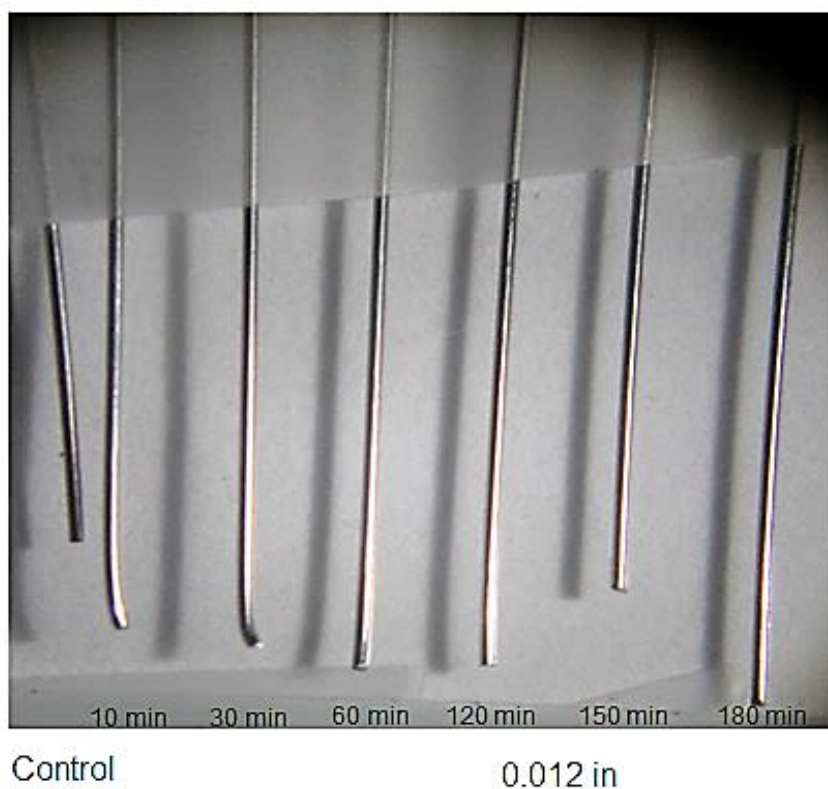


Figura 14. Fotografía de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HNO₃ 15 N.

En la Figura 15, se muestran fotografías de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con NaOH 5 N. Los alambres no presentaron desgaste aparente al ser observadas bajo el estereoscopio.

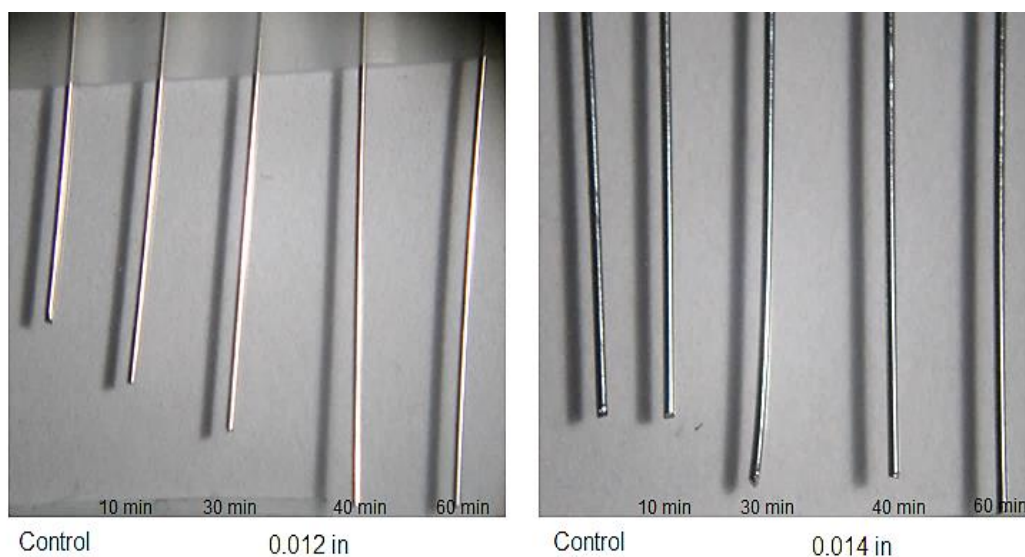


Figura 15. Fotografía de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con NaOH 5 N.

En la Figura 16, se muestran fotografías de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HCl 12 N. Los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, presentaron desgaste y presencia de porosidad a los 10 min, mientras que los de 0.014 pulgadas de diámetro a los 20 min. Sin embargo, en todos los alambres se observó una disminución considerable en su diámetro al ser analizados bajo el estereoscopio.

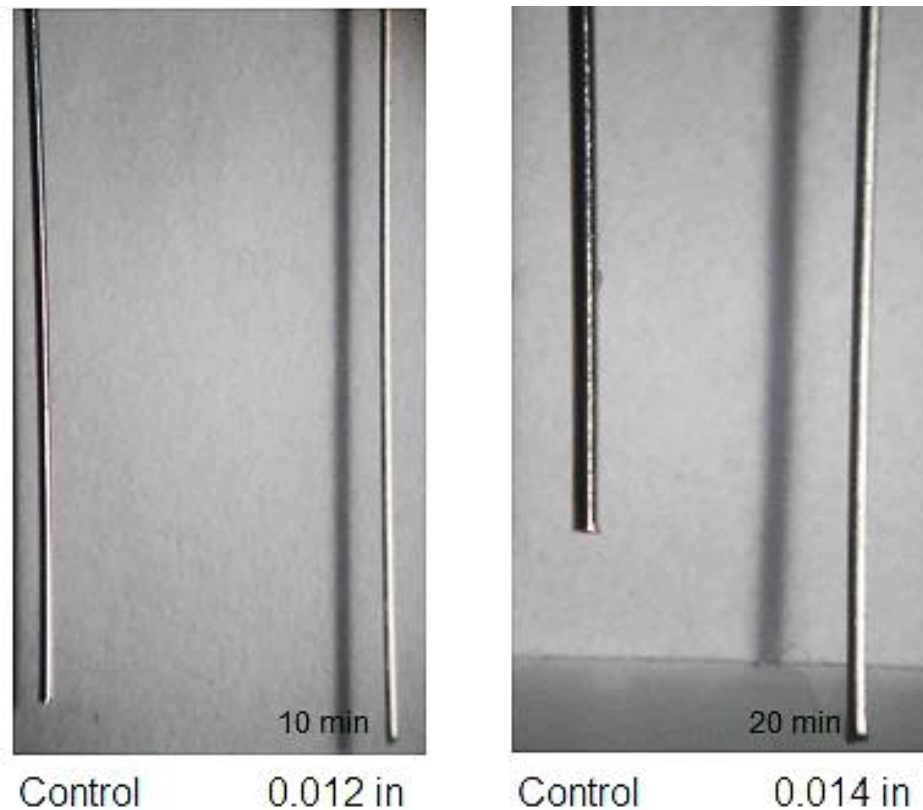


Figura 16. Fotografía de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HCl 12 N a los 10 y 20 min, respectivamente.

En la Figura 17, se muestran fotografías de los alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HCl 5 N. Al observar los alambres bajo el estereoscopio, se pudo ver que ambos alambres presentaron desgaste en todos los tiempos evaluados. A un tiempo de 60 min el desgaste fue más evidente, como se puede observar en los alambres señalados con recuadro amarillo.

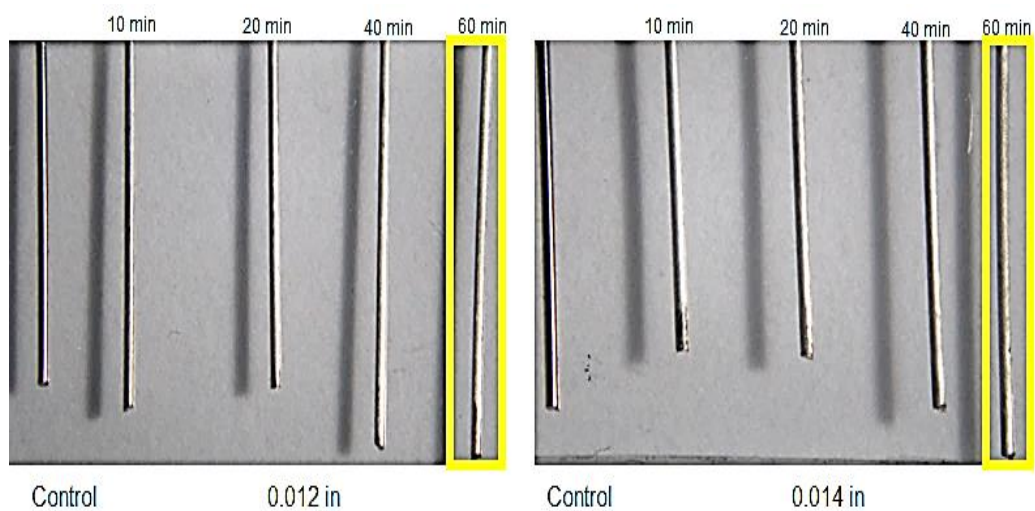


Figura 17. Alambres de 0.012 y 0.014 pulgadas de diámetro, después del tratamiento con HCl 5 N a los diferentes tiempos evaluados.

Tomando en cuenta lo anterior, las condiciones seleccionadas para el desgaste de los alambres de soporte se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de tratamiento para el desgaste de los alambres.

Tratamiento	
Solvente	HCl 5N
Tiempo	60 min
Temperatura	50 °C
Longitud de desgaste del alambre	3 cm

En la Figura 18, se muestran electromicrofotografías de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, a) sin tratamiento y b) después del tratamiento con HCl 5 N, observados en un microscopio electrónico de barrido con un detector de electrones retrodispersos.

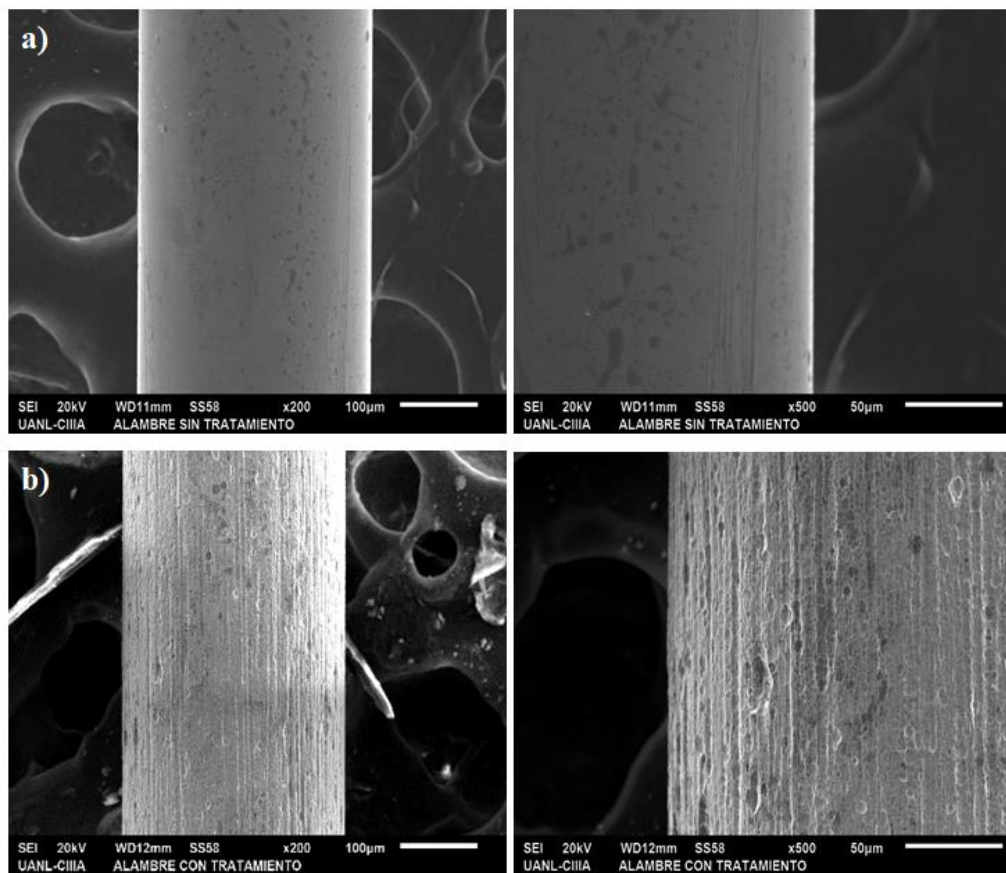


Figura 18. Electromicrofotografías de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, a) sin tratamiento y b) después del tratamiento con HCl 5 N bajo las condiciones señaladas en la Tabla 19.

5.4.2 Selección del adhesivo para formar la mezcla de recubrimiento

Los adhesivos seleccionados como posibles candidatos para formar el recubrimiento fueron: Silicón F101, Silicón líquido Pelikan, Pegamento UHU, Pegamento Total Tech, Cemento amarillo de CPVC, Nafion 117, Elastómeros de silicón Sylgard 184 y 170.

Primeramente se determinó la solubilidad de los adhesivos en diferentes disolventes orgánicos, tales como: diclorometano, acetona, tolueno y hexano; utilizando 1 g de cada adhesivo y diferentes volúmenes de los disolventes. En la Tabla 20, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 20. Condiciones de solubilidad de los adhesivos seleccionados.

Adhesivo	Solubilidad	
	Disolvente	Volumen
Silicón F101 Sista	Insoluble	
Silicón Pelikan	Diclorometano Acetona	0.50 mL
UHU	Diclorometano	0.50 mL
Pegamento Total Tech	Tolueno	0.75 mL
Cemento amarillo	Tolueno	1 mL
Sylgard 184	Diclorometano	1 mL
Sylgard 170	Diclorometano	0.5 mL
Nafion	No evaluada	

Posteriormente se determinó la miscibilidad de los diferentes adhesivos con el líquido iónico DMIM-BF₄, utilizando 0.1 g de cada adhesivo y 0.1 mL del líquido iónico, en la Tabla 21 se muestran los resultados observados en dicha prueba.

Tabla 21. Miscibilidad entre adhesivos y el líquido iónico DMIM-BF₄.

Adhesivo	Miscibilidad
Silicón Pelikan	Miscible
UHU	Miscible
Nafion 117	Miscible
Cemento amarillo	Formación de sólido
Pegamento Total Tech	No miscible
Sylgard 184	No miscible
Sylgard 170	No miscible

Tomando como base estos resultados, el desarrollo del recubrimiento se continuó empleando Nafion 117, Silicón Pelikan y UHU.

5.4.3 Recubrimiento de los alambres desgastados

Al recubrir los alambres con la mezcla de DMIM-BF₄ y Nafion, se observó que en los ciclos evaluados que consistieron de 3 ciclos con duración de 30 seg cada uno (A), 1 ciclo con duración de 1 min (B) y 3 ciclos con duración de 1 min cada uno (C), la mezcla se escurría del soporte en todos los casos. La Figura 19, muestra una fotografía de los resultados observados.



Figura 19. Fotografía del recubrimiento del alambre desgastado con la mezcla DMIM-BF₄ + Nafion.

La mezcla formada por el DMIM-BF₄ y el Silicón Pelikan, fue capaz de formar una película sobre el alambre en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, el recubrimiento formado con 3 inmersiones con duración de 1 min fue visualmente el más homogéneo. Mientras que la mezcla de DMIM-BF₄ con UHU, también fue capaz de formar una película sobre el alambre, siendo 3 inmersiones de 30 segundos la condición que brindó recubrimientos visulamente homogéneos. No obstante, con esta mezcla se observaba la formación de una gota de la mezcla en la parte distal del alambre. Para eliminar la formación de dicha gota, se añadió diclorometano a la mezcla de recubrimiento y se recubrieron nuevos alambres; los cuales formaron un recubrimiento visualmente más homogéneo sin formación de gotas en el extremo distal.

Las condiciones óptimas de recubrimiento para la fabricación de las fibras de SPME se muestran en la Tabla 22, una vez recubieratas las fibras fueron secadas durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se sometieron a secado en estufa durante 30 min a 40 °C.

Tabla 22. Condiciones óptimas del proceso de recubrimiento de 1.4 cm de los alambres desgastados para la fabricación de la fibra de SPME.

Mezclas y ciclos de recubrimiento			
Adhesivo	DMIM-BF ₄	Solvente	Ciclos de inmersión
Silicón Pelikan (0.2 g)	0.2 mL	-	3 inmersiones / 1 min
UHU (0.2 g)	0.2 mL	Diclorometano (0.1 mL)	3 inmersiones / 30 seg

Las fibras fabricadas se observaron en un microscopio digital KEYENCE VHX-500 y se pudo ver que las mezclas de los adhesivos con el DMIM-BF₄ eran capaces de formar una película delgada transparente sobre la superficie de los alambres de 0.012 pulgadas de diámetro, como se puede notar en las microfotografías de las Figuras 20 y 21.

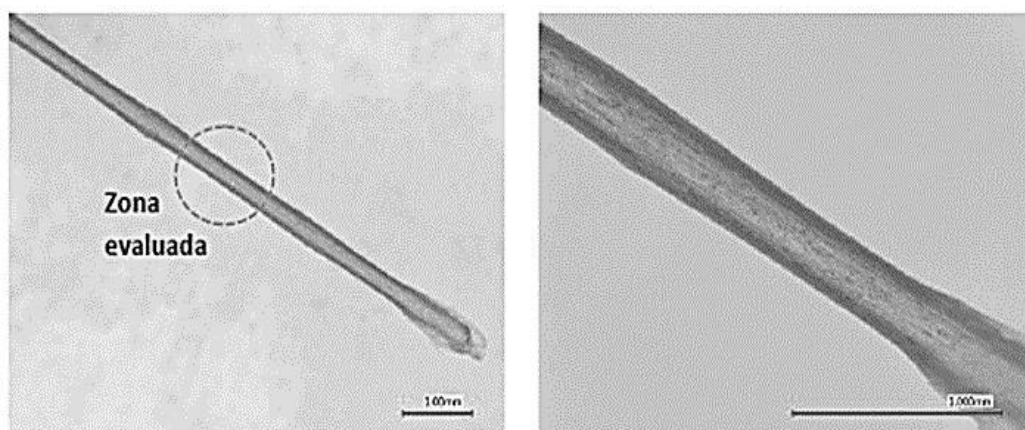


Figura 20. Microfotografía de la fibra con recubrimiento DMIM-BF₄ + Silicón Pelikan.

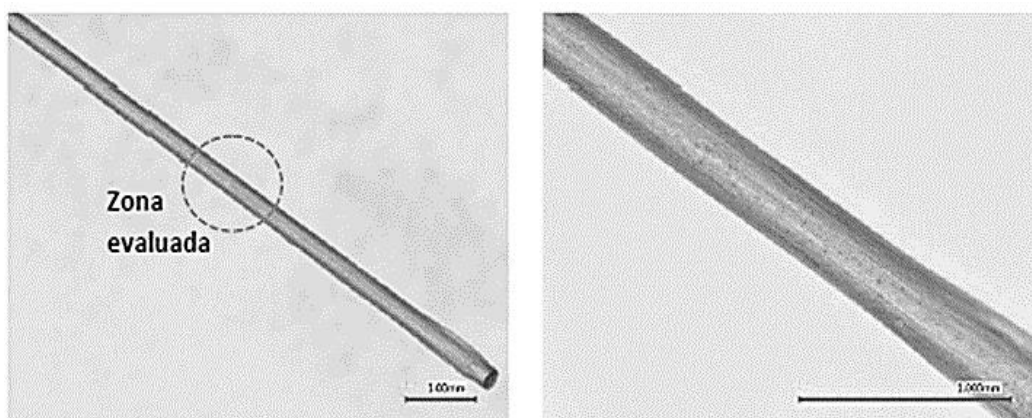


Figura 21. Microfotografía de la fibra con recubrimiento DMIM-BF₄ + UHU

5.4.4 Recubrimiento de los fragmentos de sílice

Los fragmentos de sílice fueron recubiertos con las condiciones óptimas seleccionadas anteriormente, empleando el líquido iónico y el pegamento UHU, posteriormente se secaron en la estufa a 40 °C durante 30 min.

En la Figura 22, se muestran fotografías de los fragmentos de sílice sin tartar y tratados con NaOH recubiertos con la mezcla DMIM-BF₄ + UHU, en ambos casos se puede observar escurrimiento de la mezcla evidenciado por la presencia de gotas en la parte distal de las fibras resultantes; por esta razón los fragmentos de sílice fueron descartados para ser empleadas en los siguientes experimentos.

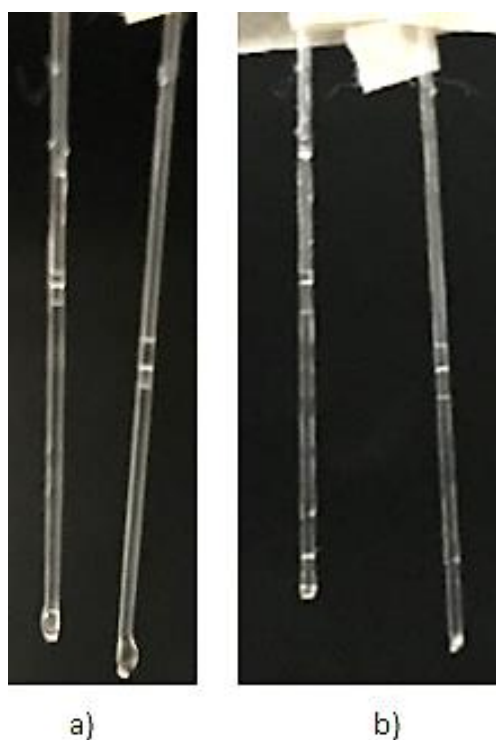


Figura 22. Fotografía de los fragmentos de sílice recubiertos con la mezcla de DMIM-BF₄ + UHU: a) Sílice sin tratamiento y b) Sílice con tratamiento.

5.5 Caracterización de la fibra de SPME

5.5.1. Uniformidad y espesor del recubrimiento

Las fibras fabricadas a base de DMIM-BF₄ + UHU y DMIM-BF₄ + Silicón Pelikan fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido con detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución.

En la Figura 23, se muestran imágenes de las zonas evaluadas de la fibra fabricada con Silicón Pelikan, en donde se pudo observar la presencia de 2 zonas de distinto espesor. La primera zona presentó un espesor promedio de 5.72 μm y la segunda un espesor promedio de 8.49 μm . En la Figura 24, se muestran las microfotografías de la fibra con la medición de las respectivas zonas.

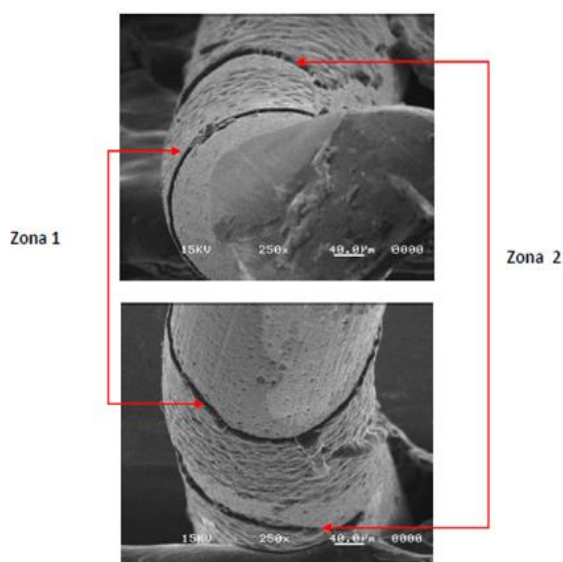


Figura 23. Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF₄ + Silicón Pelikan a un aumento de 250x, en donde se pueden distinguir las dos zonas de recubrimiento.

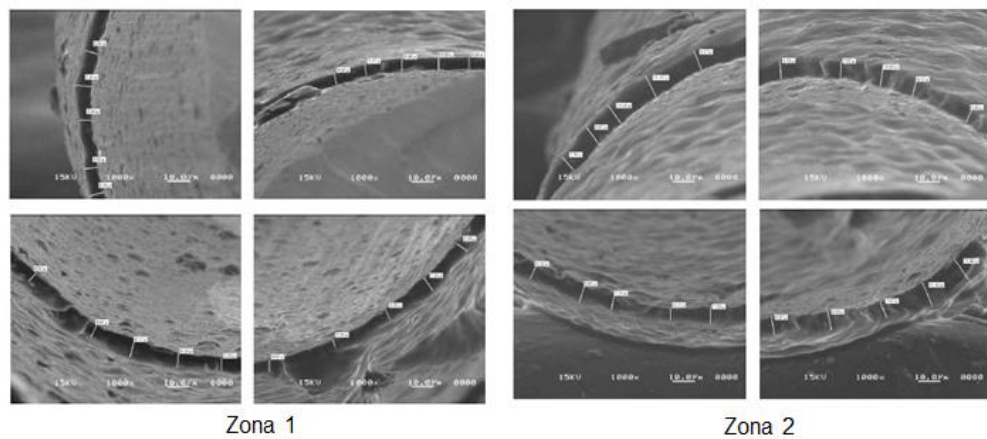


Figura 24. Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF₄ + Silicón Pelikan a un aumento de 1000x, la cual muestra distintas zonas de recubrimiento y el espesor de las mismas.

De igual manera se observó la fibra de DMIM-BF₄ + UHU, en la cual se se distingue una zona de recubrimiento con un espesor promedio de 7.12 µm. En la Figura 25 y 26, se muestran imágenes obtenidas del recubrimiento de esta fibra y la medición del mismo, respectivamente.

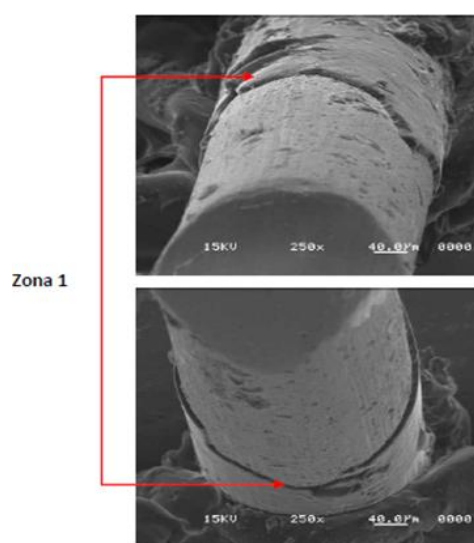


Figura 25. Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF₄ + UHU a un aumento de 250x.

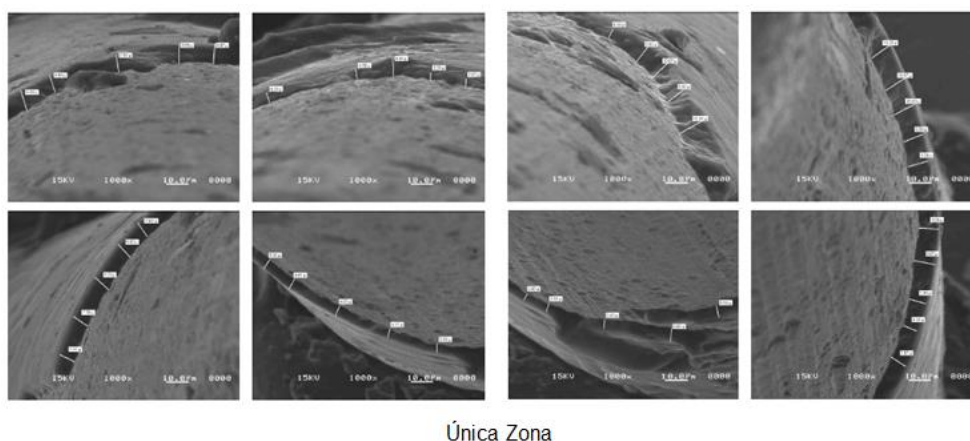


Figura 26. Electromicrofotografía de la fibra de DMIM-BF₄ + UHU a un aumento de 1000x, en donde se puede observar la zona de recubrimiento, así como la medida de su espesor.

En la Tabla 23, se resumen las medidas promedio de los espesores de los recubrimientos obtenidos en las fibras fabricadas.

Tabla 23. Medida de los espesores de los recubrimientos de las fibras fabricadas.

Fibra	Uniformidad	Espesor (μm)
Fibra DMIM-BF ₄ + Silicón Pelikan	Zona 1	5.72
	Zona 2	8.49
Fibra DMIM-BF ₄ + UHU	Zona 1	7.12

5.5.2 Selección del recubrimiento de la fibra de SPME

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la microscopía electrónica en cuanto a la uniformidad y espesor de la película, se decidió seleccionar a la fibra cuyo recubrimiento está compuesto por el IL y el adhesivo UHU, para después probar su capacidad extractante.

En experimentos posteriores se optó por recubrir 2 cm de la zona de desgaste de los alambres, aumentando la cantidad y área de recubrimiento de la fase extractante en la fibra. Las condiciones de este proceso se encuentran enlistadas en la Tabla 24.

Tabla 24. Condiciones óptimas del proceso de recubrimiento de 2.0 cm de los alambres desgastados para fabricar la fibra de SPME.

Mezclas y ciclos de recubrimiento			
Adhesivo (cantidad)	DMIM-BF ₄ (cantidad)	Solvente (cantidad)	Ciclos (inmersiones/duración)
UHU (0.3 g)	0.3 mL	Diclorometano (0.15 mL)	3 inmersiones / 30 seg

5.5.3 Caracterización del recubrimiento seleccionado por Espectrofotometría de Infrarrojo

Se obtuvieron espectros de infrarrojo del adhesivo UHU, del líquido iónico DMIM-BF₄ y de la mezcla de recubrimiento depositada sobre los alambres desgastados (Figura 27).

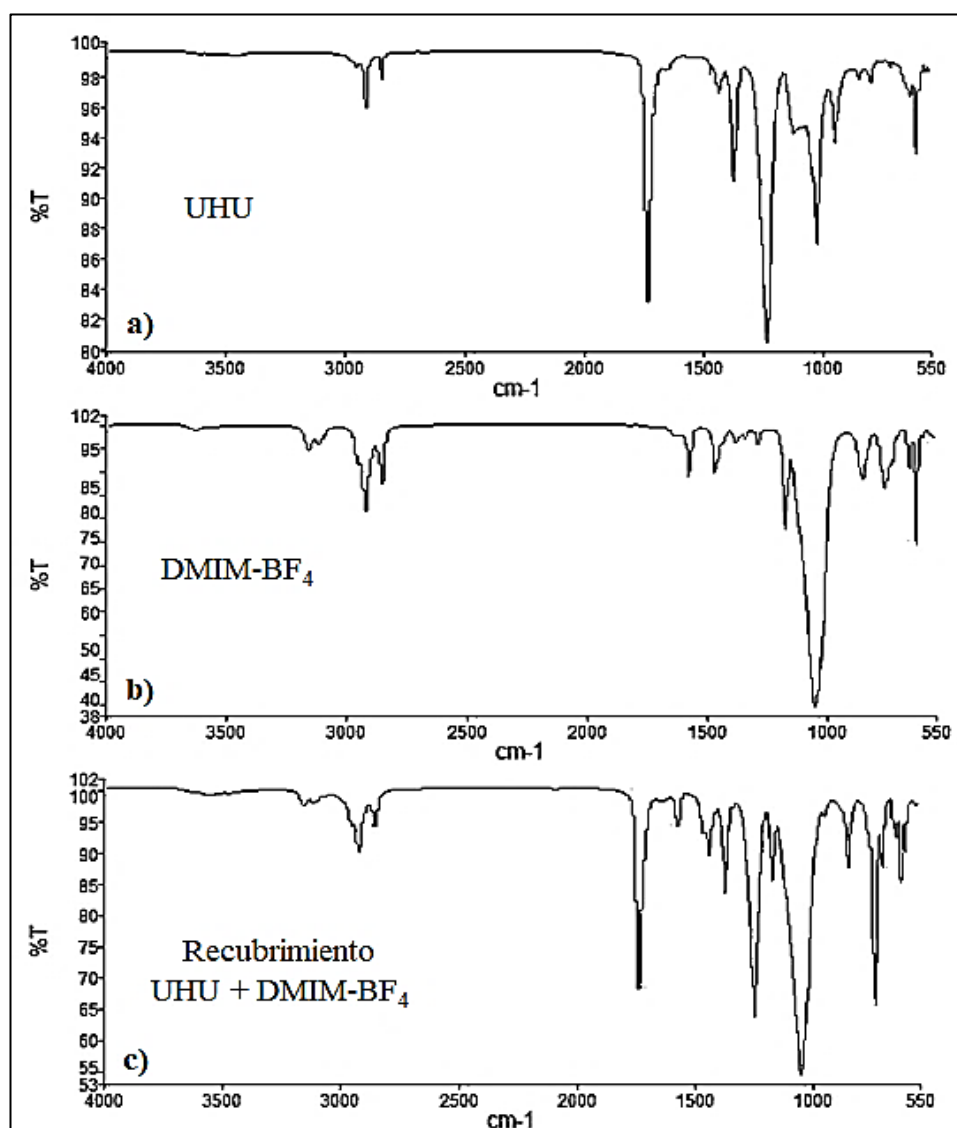


Figura 27. a) Espectro infrarrojo del UHU, b) Espectro infrarrojo del líquido iónico DMIM-BF₄ y c) Espectro infrarrojo de la mezcla de recubrimiento formada por el DMIM-BF₄ + UHU.

5.5.4 Análisis elemental del soporte metálico antes y después del recubrimiento

Como se mencionó anteriormente, las fibras desarrolladas fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido con el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución y con el detector de energía dispersiva para obtener el análisis elemental del alambre antes y después de ser recubierto.

La Figura 28 muestra una imagen del área del soporte metálico desgastado sin recubrimiento en donde se llevó a cabo el análisis elemental, así como también un espectro de energía dispersiva de Rayos X del análisis, mientras que en la Tabla 25 se resumen los resultados del mismo.

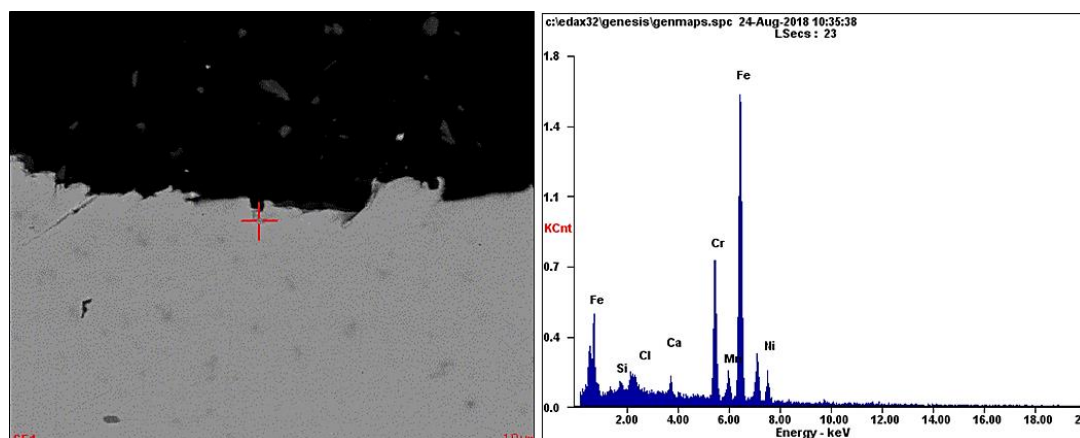


Figura 28. Área en donde se llevó a cabo el análisis elemental del soporte metálico desgastado antes de recubrirlo y espectro de energía dispersiva de Rayos X obtenido.

Tabla 25. Análisis elemental del soporte desgastado sin recubrimiento.

Elemento	Porcentaje
<i>Si</i>	01.16
<i>Cl</i>	00.24
<i>Ca</i>	01.24
<i>Cr</i>	18.15
<i>Mn</i>	01.81
<i>Fe</i>	68.76
<i>Ni</i>	08.64

La Figura 29 muestra una imagen del área del soporte metálico desgastado después de recubrirlo en donde se llevó a cabo el análisis elemental, así como también un espectro de energía dispersiva de Rayos X del análisis y la Tabla 26 muestra el resultado de dicho análisis.

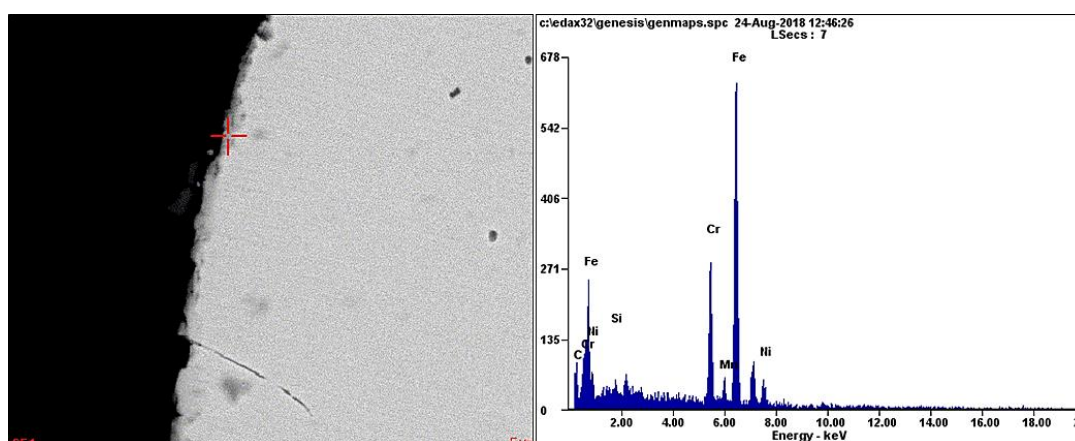


Figura 29. Área en donde se llevó a cabo el análisis elemental del soporte metálico desgastado después de recubrirlo y espectro de energía dispersiva de Rayos X obtenido.

Tabla 26. Análisis elemental del soporte desgastado con recubrimiento.

Elemento	Porcentaje
<i>C</i>	09.56
<i>Si</i>	00.77
<i>Cr</i>	16.45
<i>Mn</i>	01.60
<i>Fe</i>	64.18
<i>Ni</i>	07.44

5.5.5 Estabilidad del recubrimiento seleccionado frente a distintos disolventes y soluciones con diferentes valores de pH

Se realizaron pruebas de estabilidad de la fibra fabricada al sumergir parte del recubrimiento (1.0 cm aproximadamente) en agua desionizada, en mezclas de agua desionizada con metanol o acetonitrilo en proporciones de 5 al 20 % y en soluciones amortiguadoras de pH 3 y 9.

Después de la inmersión de las fibras en las diferentes mezclas de disolventes, las soluciones de inmersión fueron inyectadas en el HPLC. En ninguno de los casos la fibra mostró pérdida aparente del recubrimiento y no se observó señal cromatográfica correspondiente al líquido iónico en ninguna de las pruebas.

En la Figura 30a se muestra un ejemplo de un cromatograma obtenido de la mezcla de DMIM-BF₄ y metanol, mientras que la Figura 30b es un ejemplo de un cromatograma obtenido de la mezcla agua-metanol (80:20) después de la inmersión de la fibra.

De la misma manera, la Figura 31a es un ejemplo de un cromatograma obtenido de la mezcla de agua- DMIM-BF₄-acetonitrilo, mientras que la Figura 31b es un ejemplo de un cromatograma obtenido de la mezcla agua-acetonitrilo (80:20) después de la inmersión de la fibra.

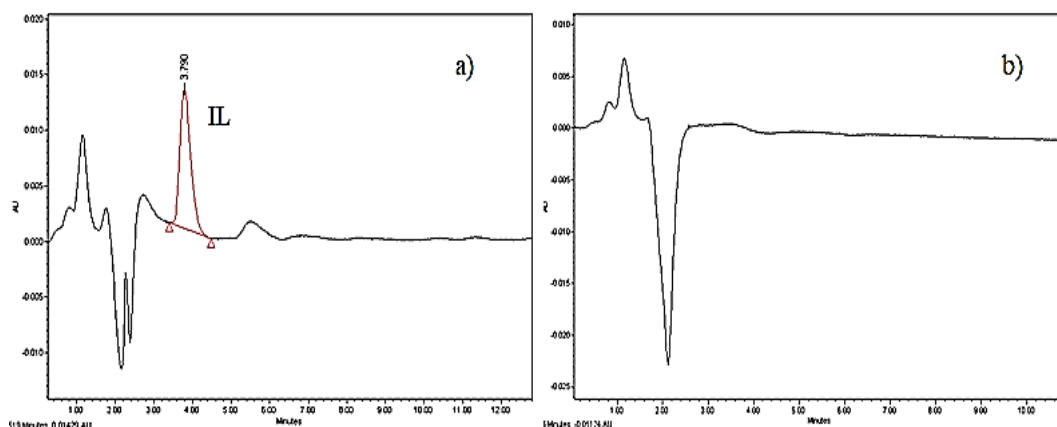


Figura 30. a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF₄-metanol y b) Cromatograma obtenido para una mezcla agua-metanol (80:20) después de la inmersión de la fibra.

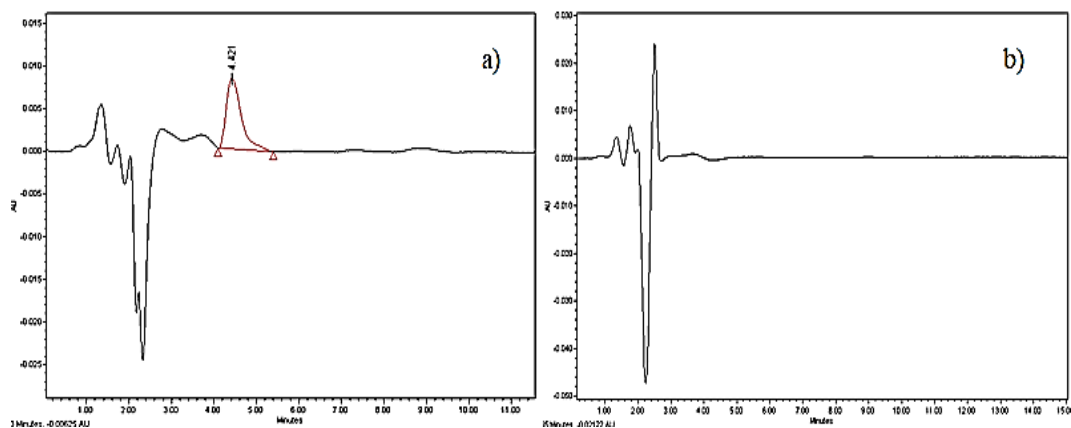


Figura 31. a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF₄-acetonitrilo y b) Cromatograma obtenido para una mezcla agua-acetonitrilo (80:20) después de la inmersión de la fibra.

Por otra parte, se realizaron pruebas de estabilidad de la fibra fabricada al sumergir parte del recubrimiento (1 cm aproximadamente) en soluciones amortiguadoras de pH 3 y 9.

Los cromatogramas obtenidos de las soluciones de inmersión, presentan la señal correspondiente al líquido iónico, lo que evidencia la pérdida de líquido iónico del recubrimiento tras la inmersión a estos valores de pH, además, conforme aumenta el número de inmersiones realizadas a una misma fibra, la señal del líquido iónico disminuye en las diferentes soluciones.

La Figura 32 y 33 muestran cromatogramas correspondientes a la inmersión de las fibras en soluciones de pH 3 y pH 9, respectivamente.

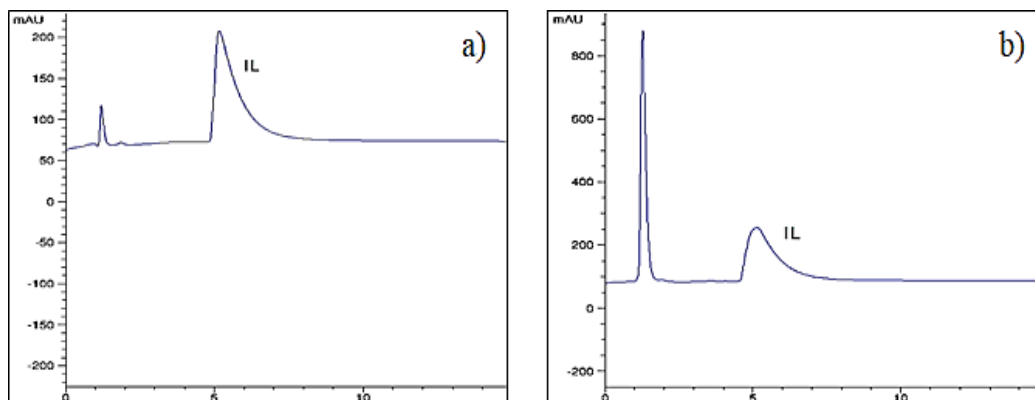


Figura 32. a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF₄ en metanol y solución amortiguadora pH3 (60:40) y b) Cromatograma obtenido para la solución de pH 3 después de la inmersión de la fibra.

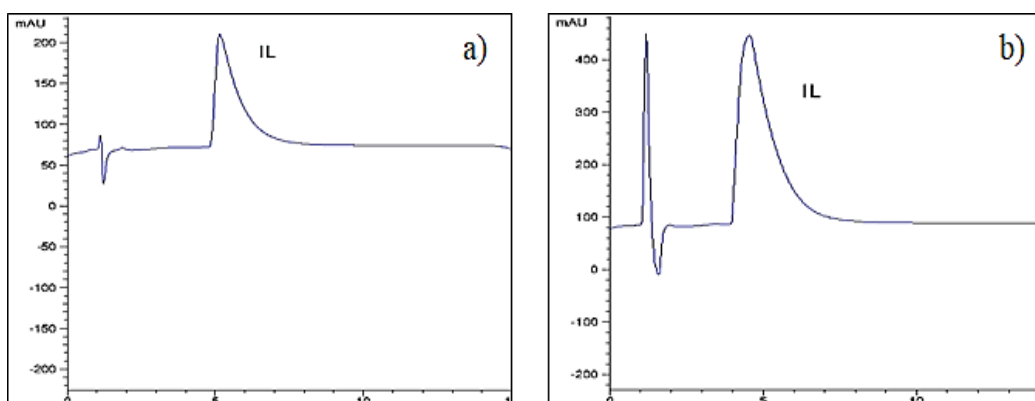


Figura 33. a) Cromatograma obtenido para una mezcla de DMIM-BF₄ en metanol y solución amortiguadora pH 9 (60:40) y b) Cromatograma obtenido para la solución de pH 9 después de la inmersión de la fibra.

5.5.6 Capacidad de extracción del recubrimiento seleccionado

Para demostrar la capacidad extractante de la fibra, se llevaron a cabo extracciones por triplicado de los estándares de PPCPs ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), empleando fibras recubiertas con UHU y fibras recubiertas con el DMIM-BF₄ + UHU, recubriendo 1.4 cm de la fibra.

En la Figura 34 se muestra un ejemplo de un cromatograma obtenido tras la extracción del estándar de PPCPs con la fibra recubierta con UHU y en la Figura 35 un cromatograma obtenido de la extracción de la mezcla de PPCPs con la fibra recubierta con la mezcla DMIM-BF₄ + UHU.

El gráfico de la Figura 36, muestra la comparación de las respuestas obtenidas para cada uno de los analitos extraídos empleando fibras recubiertas únicamente con el adhesivo y fibras recubiertas con la mezcla líquido iónico más adhesivo.

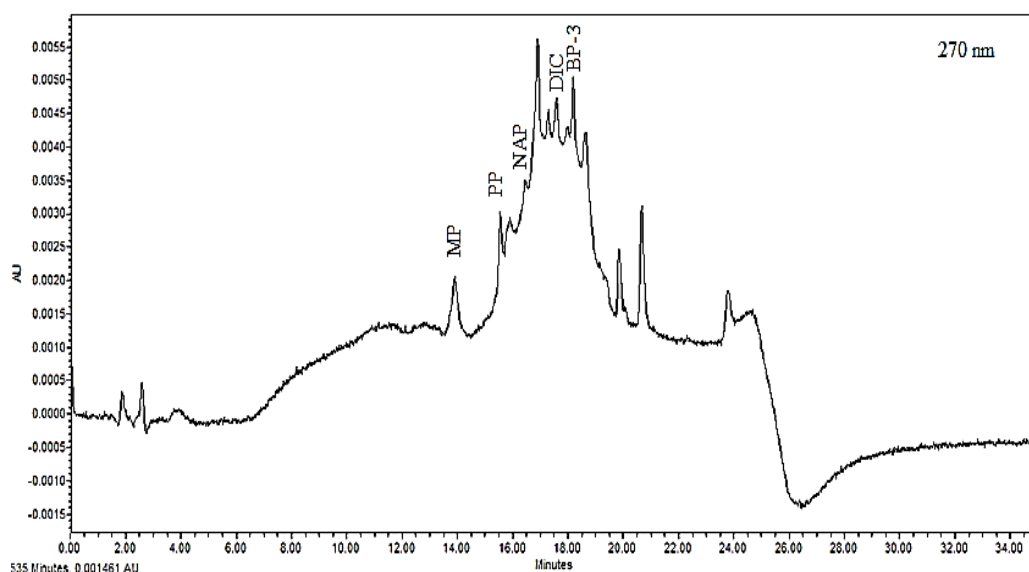


Figura 34. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) extraídos con la Fibra recubierta con UHU, bajo las condiciones de la Tabla 17.

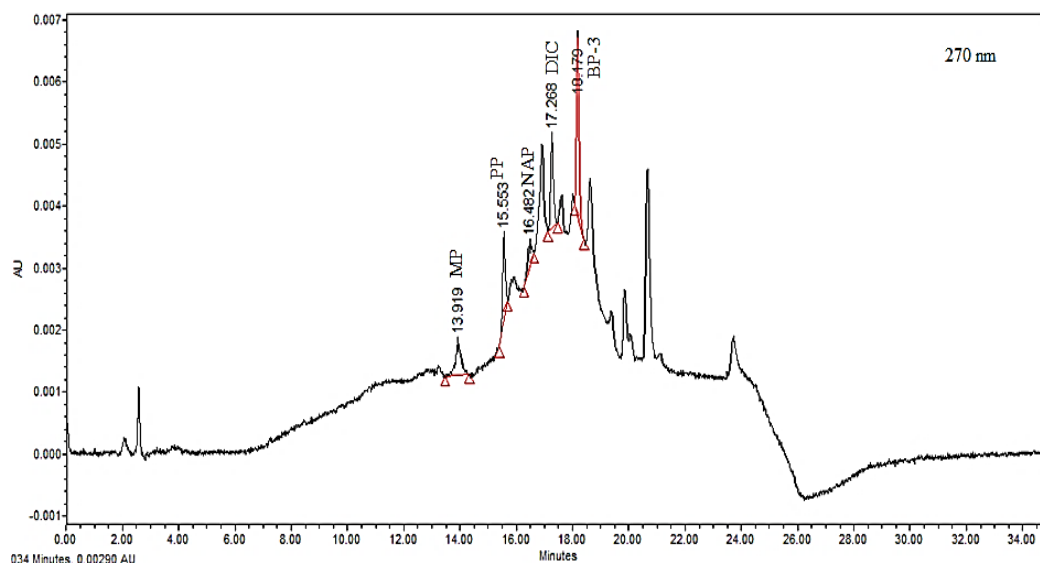


Figura 35. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) extraídos con la Fibra recubierta con DMIM-BF₄ + UHU, bajo las condiciones de las Tabla 17.

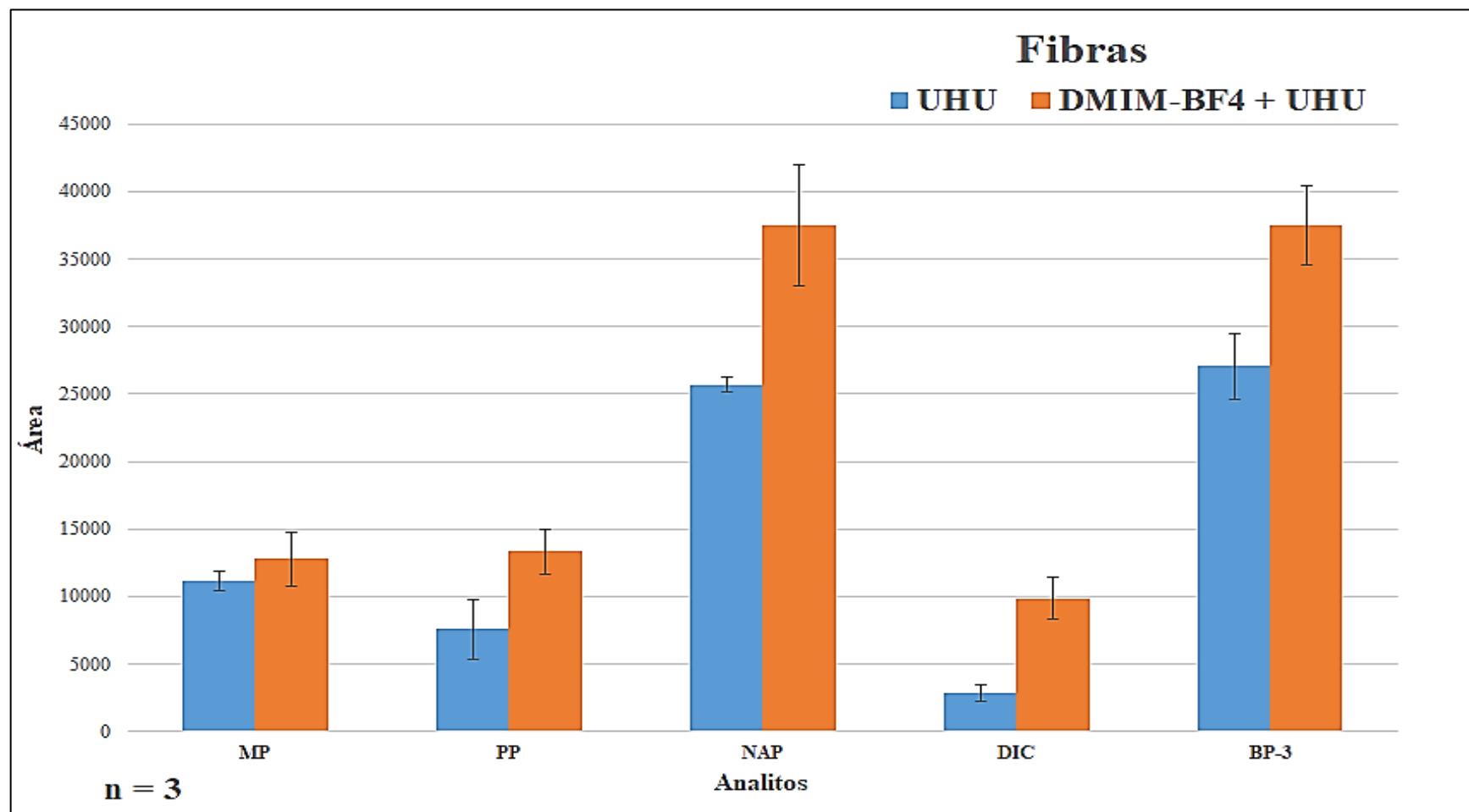


Figura 36. Comparación de la capacidad extractante de fibras recubiertas solo con UHU y fibras recubiertas con DMIM-BF₄ + UHU.

5.6 Evaluación de la competencia de los analitos hacia la fibra

Para evaluar la posible competencia entre los analitos hacia el recubrimiento de la fibra, se realizaron extracciones de estándares individuales de cada uno de ellos ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) empleando fibras recubiertas con la mezcla UHU + DMIM- BF_4 , por triplicado.

Para la metformina, cafeína y benzoфеона-4, no se observó señal cromatográfica en ninguna de las extracciones realizadas.

En la Figura 37 se muestra un gráfico con la comparación de las áreas obtenidas en la extracción de los analitos de forma individual y cuando se encontraban en mezcla con el resto de los PPCPs a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En los cromatogramas de la Figura 38, se puede ver como después de la extracción de los estándares individuales no se encontraba señal correspondiente a metformina, cafeína o benzoфеона-4.

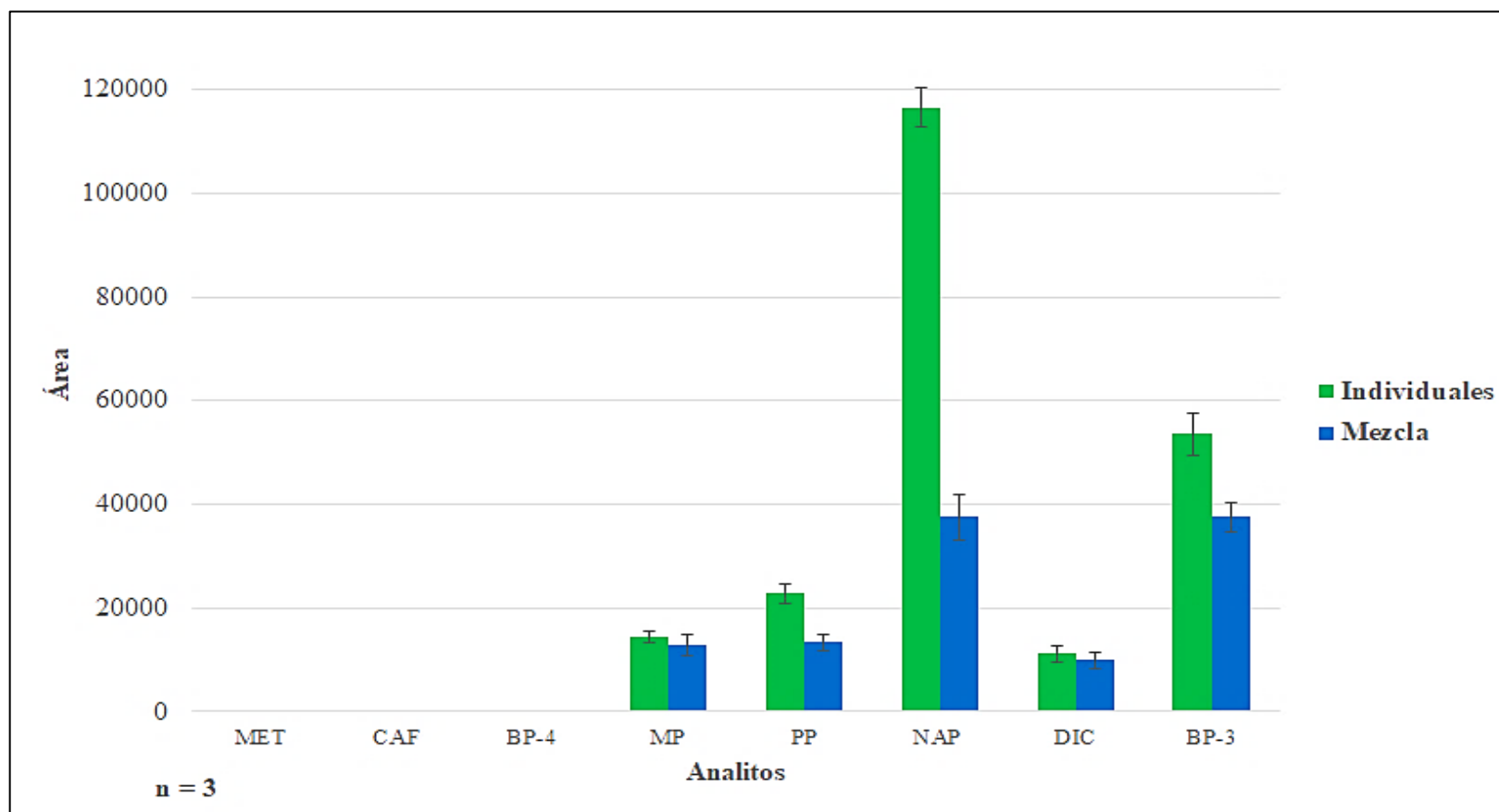


Figura 37. Comparación de la extracción de soluciones estándar de los analitos a una concentración de 2 µg mL⁻¹ individuales y en mezcla con la fibra recubierta con DMIM-BF₄ + UHU.

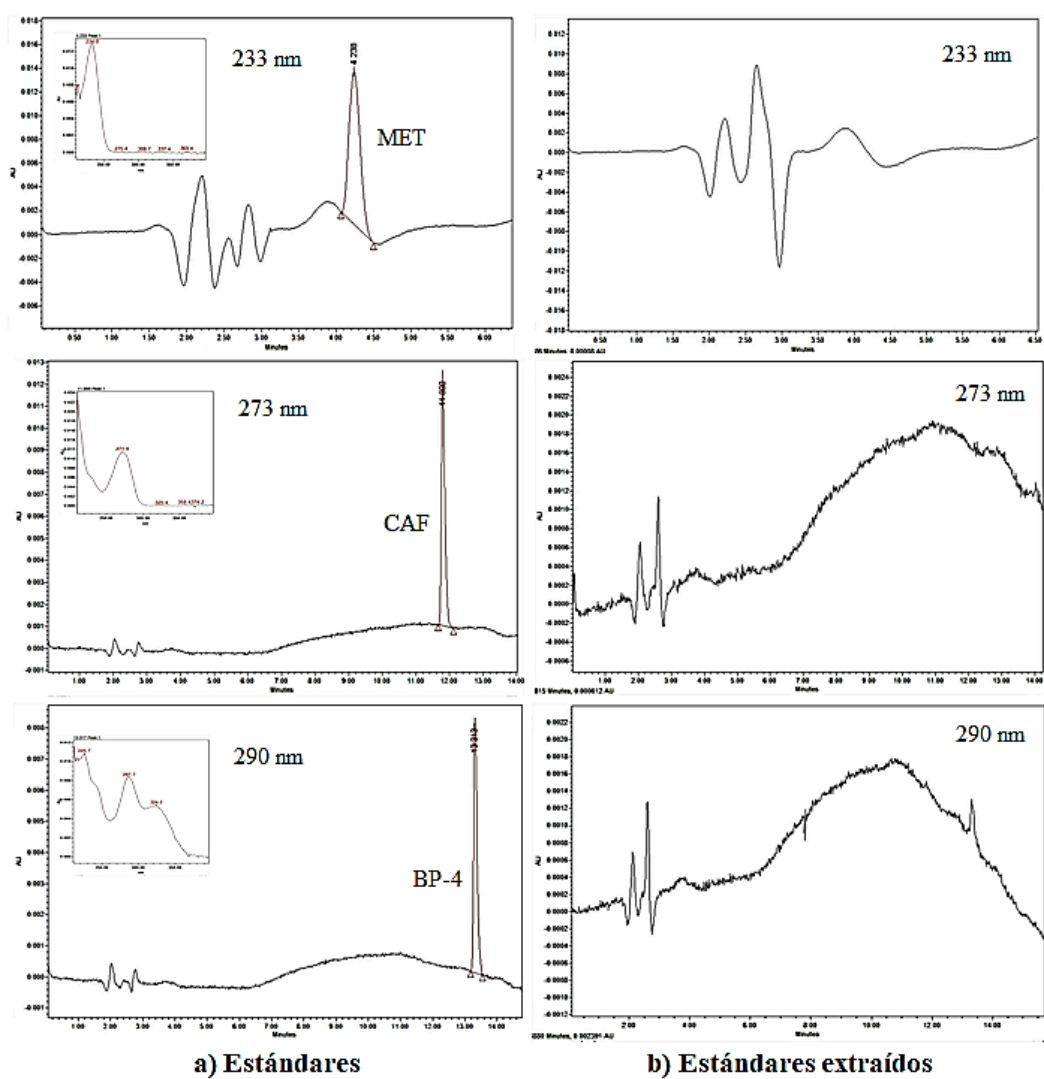


Figura 38. a) Cromatogramas obtenidos de los estándares individuales de MET, CAF y BP-4, b) Cromatogramas obtenidos de los estándares de MET, CAF y BP-4 extraídos, ambos bajo las condiciones de la Tabla 17.

Como se mencionó anteriormente, en el desempeño de la extracción de la fibra desarrollada no se encontró señal correspondiente a tres (MET, CAF y BP-4) de los ocho analitos. Debido a lo anterior, no era necesario un método en el que se considerara la separación de estos para el análisis del total de analitos modelo. Por lo tanto, se evaluaron diversas condiciones para encontrar uno método cromatográfico capaz de separar a los cinco analitos que si eran extraídos (MP, PP, NAP, DIC y BP-3), en el menor tiempo posible.

Las condiciones óptimas seleccionadas para el análisis de los cinco PPCPs extraídos se encontraron empleando el cromatógrafo Waters 2695, la columna Discovery HSF5 y el metanol como modificador orgánico, un resumen de estas condiciones se encuentran en la Tabla 27. En la Tabla 28 se muestran los tiempos de retención de los analitos bajo estas condiciones y la Figura 39 es un cromatograma obtenido bajo las condiciones óptimas seleccionadas.

Tabla 27. Condiciones óptimas seleccionadas para el análisis de los cinco PPCPs extraídos con las fibras fabricadas.

Condiciones	
Flujo	0.2 mL min ⁻¹
Temperatura	45 °C
Gradiente	
t (min)	% Metanol
0	60
9	85
11	85
12	60
25	60

Tabla 28. Tiempos de retención obtenidos para los cinco PPCPs extraídos con las fibras fabricadas.

Analito	Tiempo de retención, min (DE)
MP	3.884 (0.011)
PP	5.994 (0.009)
NAP	8.599 (0.016)
DIC	10.630 (0.027)
BP-3	12.320 (0.011)

Este sistema cromatográfico fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, acuerdo a lo especificado en el apartado 4.4.3 y los resultados se presentan en la Tabla 29.

En el apartado 10.2 del Capítulo 10 (Anexos), se muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos bajo las distintas condiciones evaluadas en la separación de los cinco PPCPs extraídos (Figuras 2F – 2K).

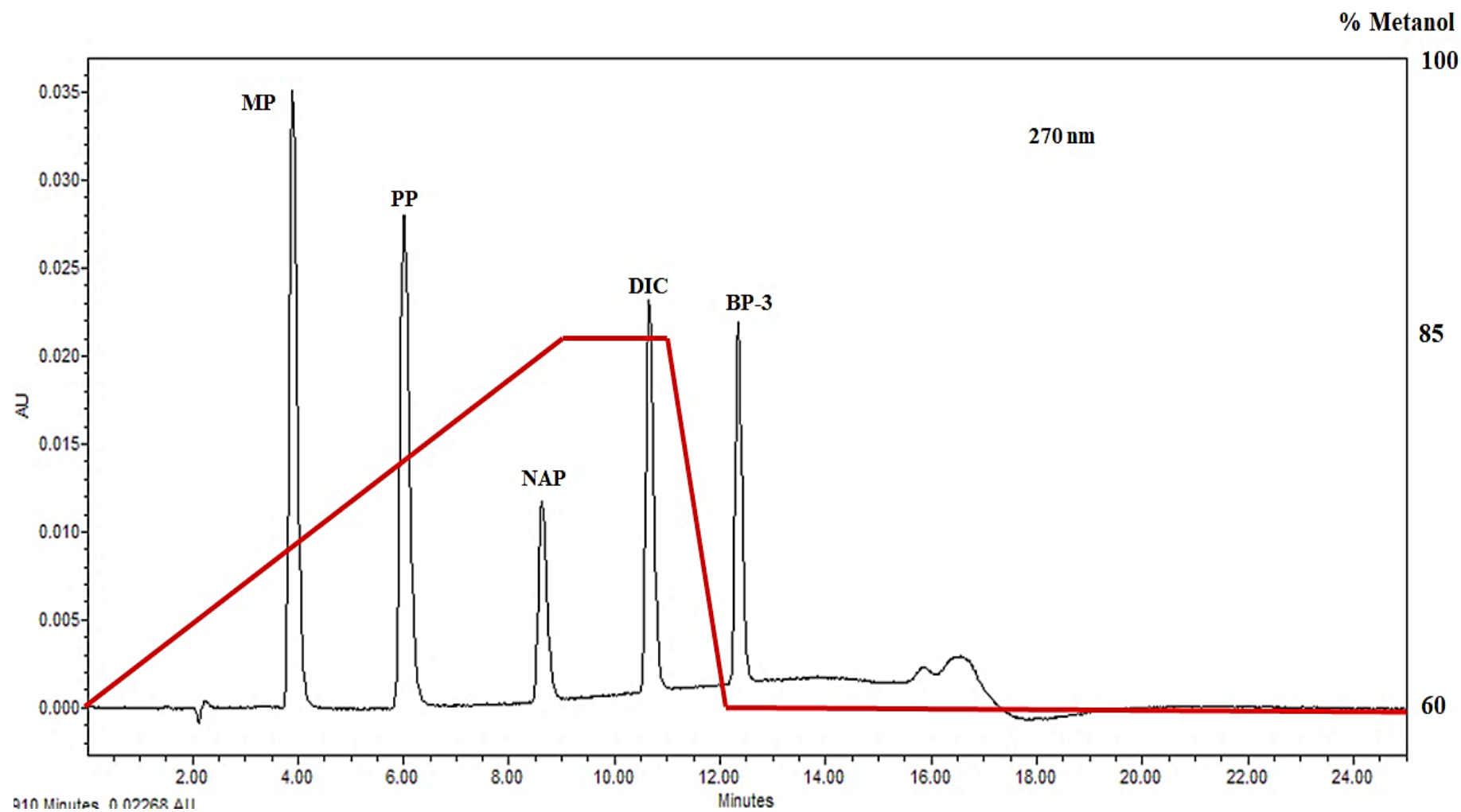


Figura 39. Cromatograma obtenido para una solución estándar de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en buffer de formiatos 40 mM (pH 4) y metanol (70:30), bajo las condiciones de la Tabla 27.

Tabla 29. Resultados de la validación del sistema cromatográfico para el análisis de los cinco PPCPs extraídos.

Analito	Linealidad			Precisión % DER de las respuesta	Exactitud	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Ecuación de regresión	r^2	% DER de los factores de respuesta				
MP 257 nm	$y = 153778x + 42972$	0.999	3.936	0.80 – 4.12	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.086	0.259
PP 257 nm	$y = 131743x + 33943$	0.999	4.471	0.20 – 3.99	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.097	0.297
NAP 232 nm	$y = 421156x + 359461$	0.999	4.696	0.42 – 2.68	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.112	0.336
DIC 280 nm	$y = 54818x + 533.48$	0.999	3.982	0.61 – 4.69	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.119	0.357
BP-3 290 nm	$y = 34482x + 4420$	0.999	3.557	0.02 - 2.63	$m = 1.000$ $r^2 = 0.999$	0.062	0.186

Con el objetivo de aumentar la cantidad de analito extraído, se realizaron extracciones de estándares de PPCPs ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) con fibras recubiertas con el líquido iónico DMIM- BF_4 y el adhesivo UHU con un recubrimiento de 1.4 cm y 2 cm de longitud del alambre desgastado. Las soluciones de desorción fueron inyectadas al cromatógrafo Waters 2695 y analizadas por el método previamente validado para el análisis de los 5 PPCPs extraídos.

En la Figura 40 se presenta un gráfico de la comparación de la eficiencia de extracción de las fibras recubiertas con ambas longitudes de recubrimiento.

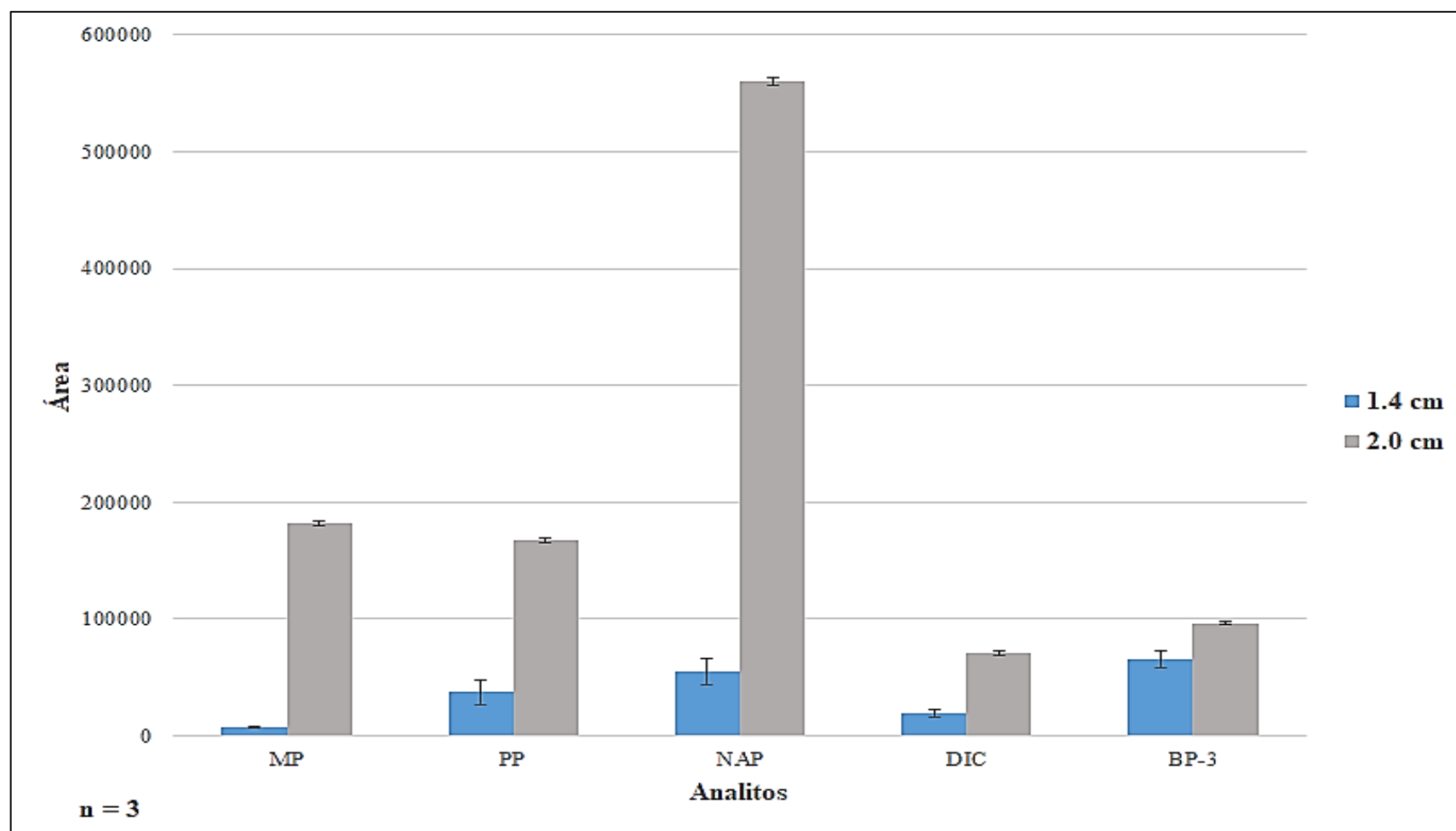


Figura 40. Comparación de la eficiencia de extracción de fibras recubiertas con 1.4 y 2.0 cm de fase extractante.

5.7 Desempeño de la fibra en extracciones consecutivas

Se realizaron tres extracciones seriadas con la misma fibra a diferentes estándares de los PPCPs a la misma concentración.

Los resultados obtenidos en las extracciones consecutivas con cada una de las fibras (Fibra A, B y C) son los que se muestran en el gráfico de la Figura 41, los cuales mostraron valores de % DER en un rango de 9.87 a 54.29 %.

De igual modo, las Figuras 42 y 43 son ejemplos de los cromatogramas obtenidos.

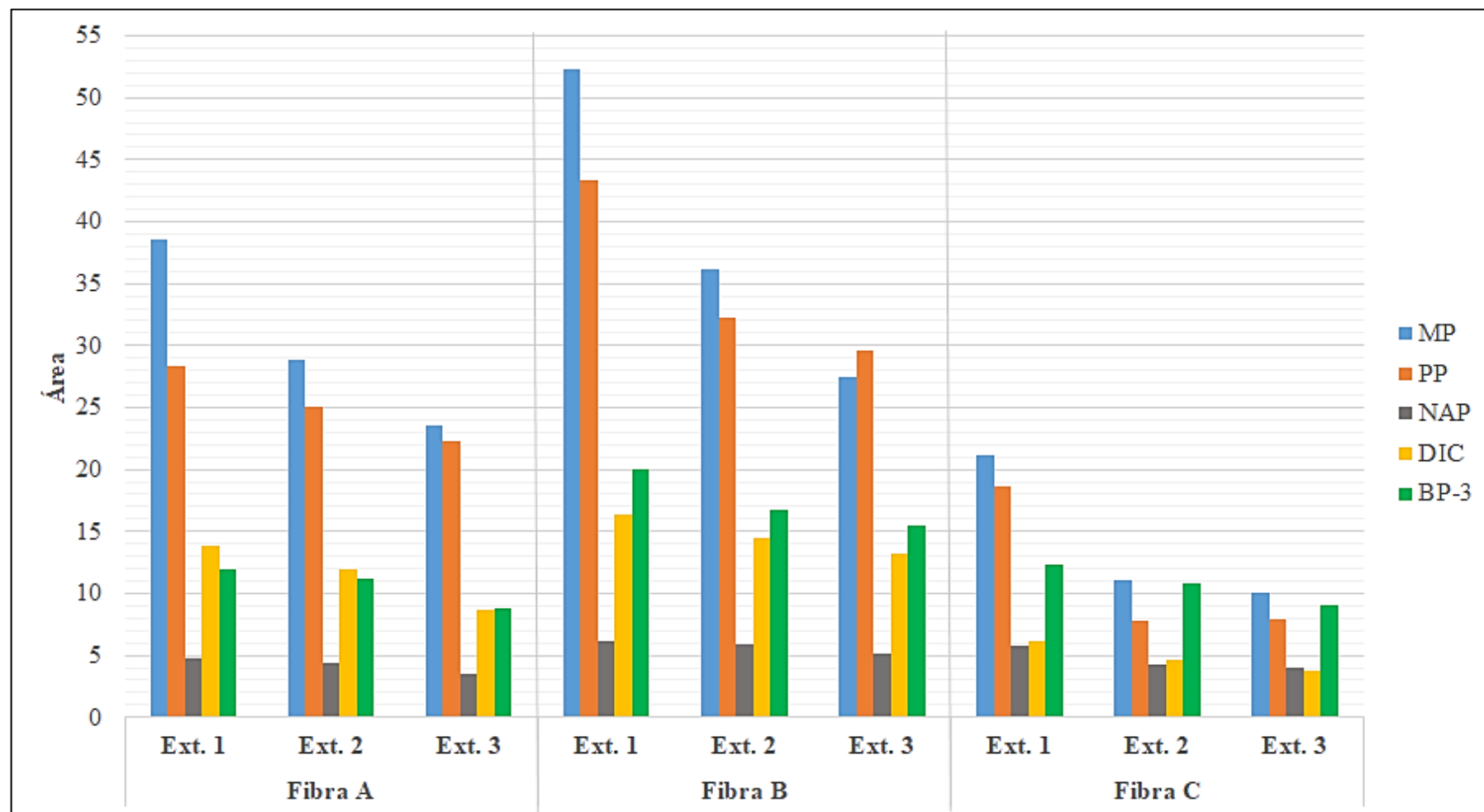


Figura 41. Comparación del desempeño de la fibra en extracciones consecutivas.

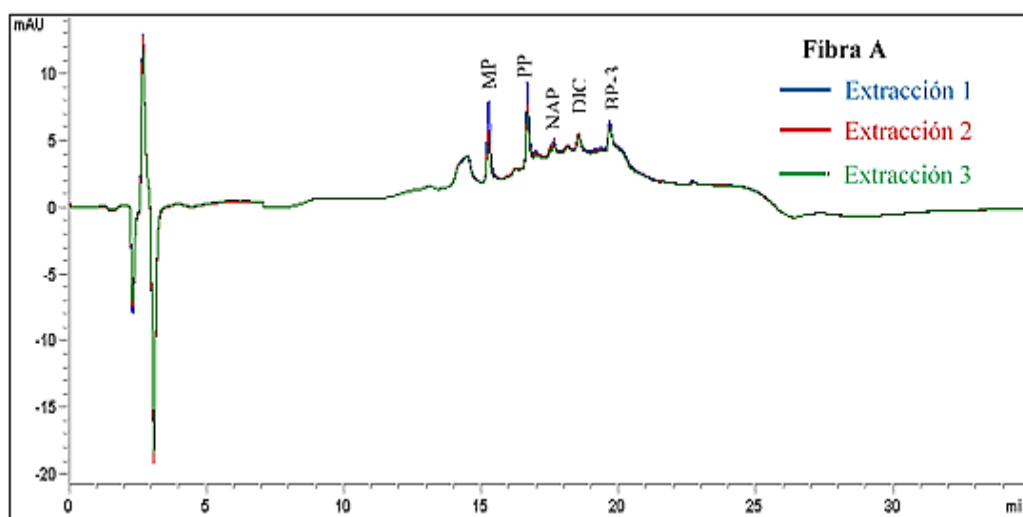


Figura 42. Cromatograma obtenido para una mezcla de extracción de PPCPs ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) con la Fibra recubierta con la mezcla UHU + DMIM- BF_4 , bajo las condiciones de la Tabla 15.

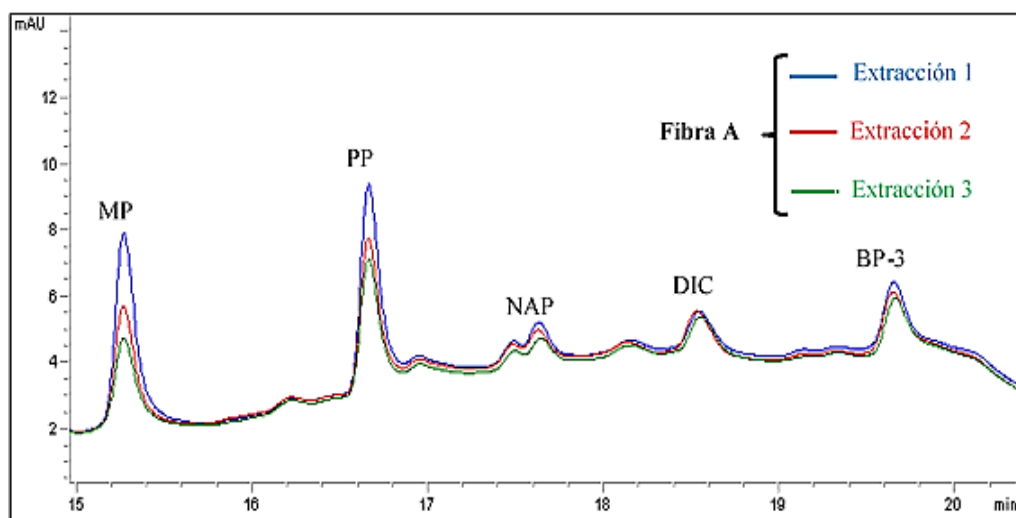


Figura 43. Cromatograma obtenido para una mezcla de extracción de PPCPs ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) con la Fibra recubierta con la mezcla UHU + DMIM- BF_4 , bajo las condiciones de la Tabla 15.

5.8 Establecimiento del método de extracción de los analitos modelo por SPME en modalidad de inmersión directa

5.8.1 Optimización de la extracción

Para evaluar el efecto y la significancia de los factores en la extracción de los analitos, se llevó a cabo un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} aleatorizado con 4 puntos centrales. Después se construyeron los gráficos de coeficientes de regresión escalados y centrados, a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en cada uno de los experimentos.

Como puede verse en los gráficos de la Figura 44, la temperatura tuvo un efecto significativo para la respuesta de MP, NAP y DIC, mientras que la agitación de la muestra fue significativa en la extracción del PP, DIC y BP-3. Por otra parte, la fuerza iónica (concentración de sal) fue un factor que solo tuvo efecto significativo en las respuestas del NAP. Sin embargo, el tipo de sal añadida a la muestra fue significativo para todos los analitos, excepto para DIC.

El tiempo no tuvo un efecto significativo en la repuesta de ninguno de los analitos, por lo que se seleccionó el periodo más corto de extracción (15 min).

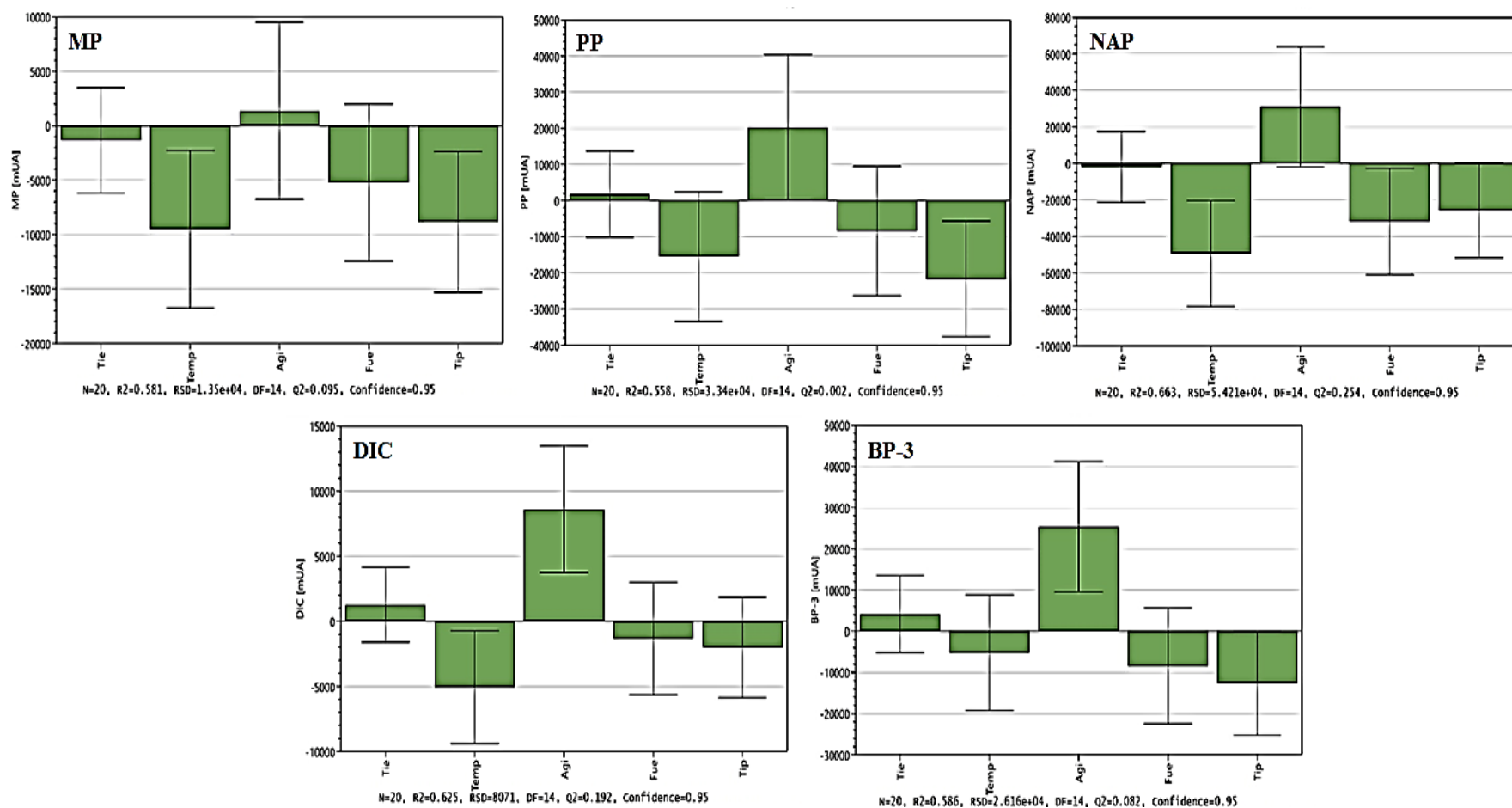


Figura 44. Gráficos de coeficiente escalados y centrados para el efecto estandarizado de los factores tiempo, temperatura, agitación, fuera iónica y tipo de sal, evaluados en la optimización de la extracción de los PPCPs estudiados.

En los experimentos en donde se evaluó el efecto de la fuerza iónica o “salting out”, se observó que al utilizar Na_2CO_3 , la película de la fase extractante cambiaba a un color blanco y mostraba cristales depositados sobre la fase. Tal y como puede verse en la imagen de la Figura 45, por lo que esta sal fue descartada para ser utilizada en los ensayos posteriores.

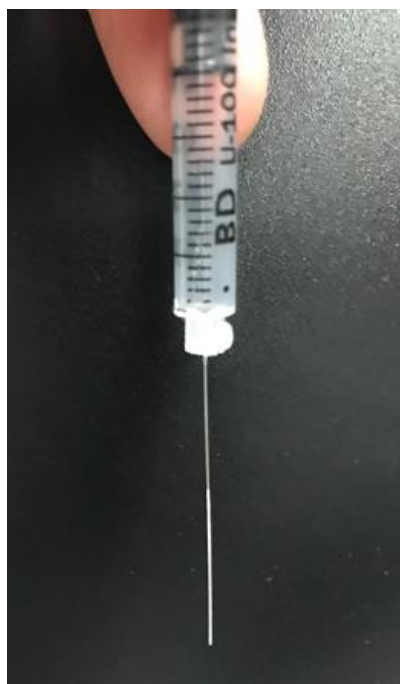


Figura 45. Fibra utilizada en el efecto de “salting out” con Na_2CO_3 .

Debido a los resultados anteriores y a lo observado en el diseño de experimentos, se decidió fijar los parámetros de tiempo (15 min), agitación (800 rpm) y el tipo de sal (NaCl) para los siguientes experimentos, por lo que los factores que se optimizaron factor por factor fueron la concentración de sal añadida y la temperatura.

Inicialmente, para llevar a cabo la optimización de estos factores, se realizó una prueba de modelado de dos factores (concentración de NaCl añadido y temperatura); de estos experimentos se generaron los gráficos de contorno.

Como se puede ver en las gráficas de contorno de la Figura 46, para todos los analitos con bajas temperaturas y bajas concentraciones de sal, se maximiza la respuesta. Los valores predictivos de contenido de sal estuvieron en un rango de 0 a 4.5 % de NaCl y un rango de temperatura de 25 a 28 °C. Durante todos los experimentos se trabajó a temperatura de laboratorio (21 - 22 °C), codificado en el diseño como 25 °C, por lo tanto, se decidió trabajar a esta temperatura durante el resto del proceso.

Debido a lo anterior el único factor a optimizar fue la cantidad de sal añadida, para esto se hizo uso de un diseño de factor por factor, tal y como observa en la Tabla 30, llevándose a cabo 3 ensayos por triplicado para un total de 9 experimentos.

Tabla 30. Variables utilizadas en la optimización de la cantidad de NaCl en la extracción.

Factor	Unidades	Valor		
Tiempo	minutos	15		
Temperatura	°C	Temperatura de laboratorio		
Agitación	rpm	800		
Tipo de sal	NaCl			
Fuerza iónica	% p/v	0	3	5

En la gráfica de la Figura 47, se muestran los resultados obtenidos en la optimización del contenido de NaCl. Como puede verse en esta gráfica, la recuperación de MP y PP aumenta conforme se incrementa el contenido de sal, mientras que un efecto opuesto se observa con DIC y BP-3, mientras que con el NAP se observa un comportamiento variable.

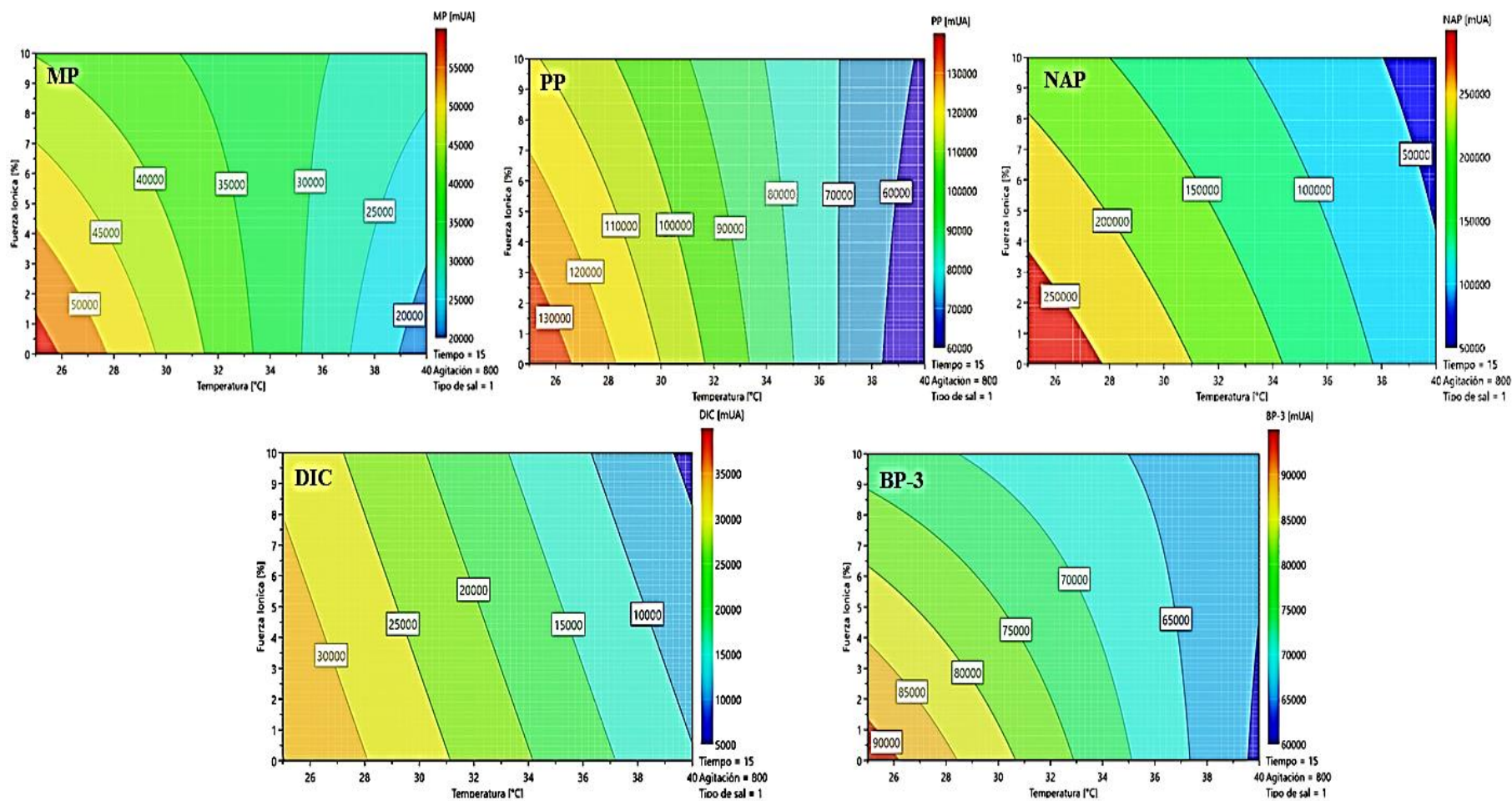


Figura 46. Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de los factores cantidad de sal añadida y temperatura en la optimización de la extracción de los PPCPs estudiados.

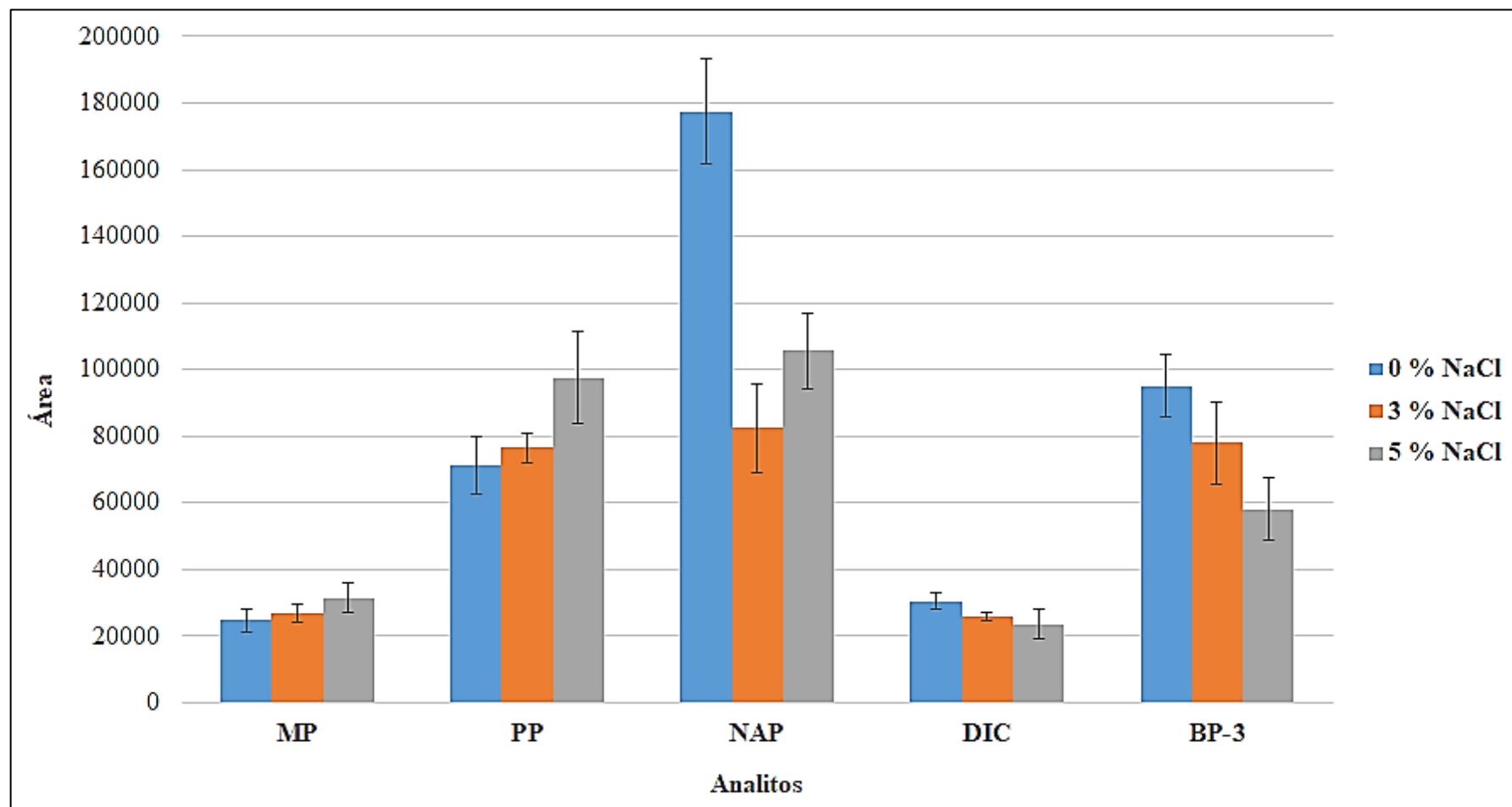


Figura 47. Efecto de la concentración de NaCl sobre la eficiencia de la extracción.

5.8.2 Optimización de la desorción.

Para evaluar el efecto y la significancia de los factores en la desorción de los analitos, se llevó a cabo un diseño factorial completo 2^3 aleatorizado sin puntos centrales. Después, se construyeron los gráficos de coeficientes de regresión escalonados y centrados, a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en cada uno de los experimentos.

Como se puede ver en los gráficos de coeficiente de la Figura 49, el tipo de disolvente fue un factor que presentó efecto significativo solamente para la respuesta de NAP, para los demás analitos no se encontró diferencia en las respuestas. La proporción de disolvente tuvo un efecto significativo para todas las moléculas estudiadas, excepto para DIC. El factor tiempo presentó un efecto significativo solo en la respuesta obtenida para el analito BP-3.

Al revisar los resultados de todos los experimentos del diseño se observó que era evidente que a mayor proporción de disolvente (70:30) se encontraba una mayor recuperación para todos los analitos, por lo que se decidió fijar este parámetro para los estudios subsecuentes. Por lo tanto, los factores optimizados factor por factor fueron el tipo de disolvente y el tiempo de desorción.

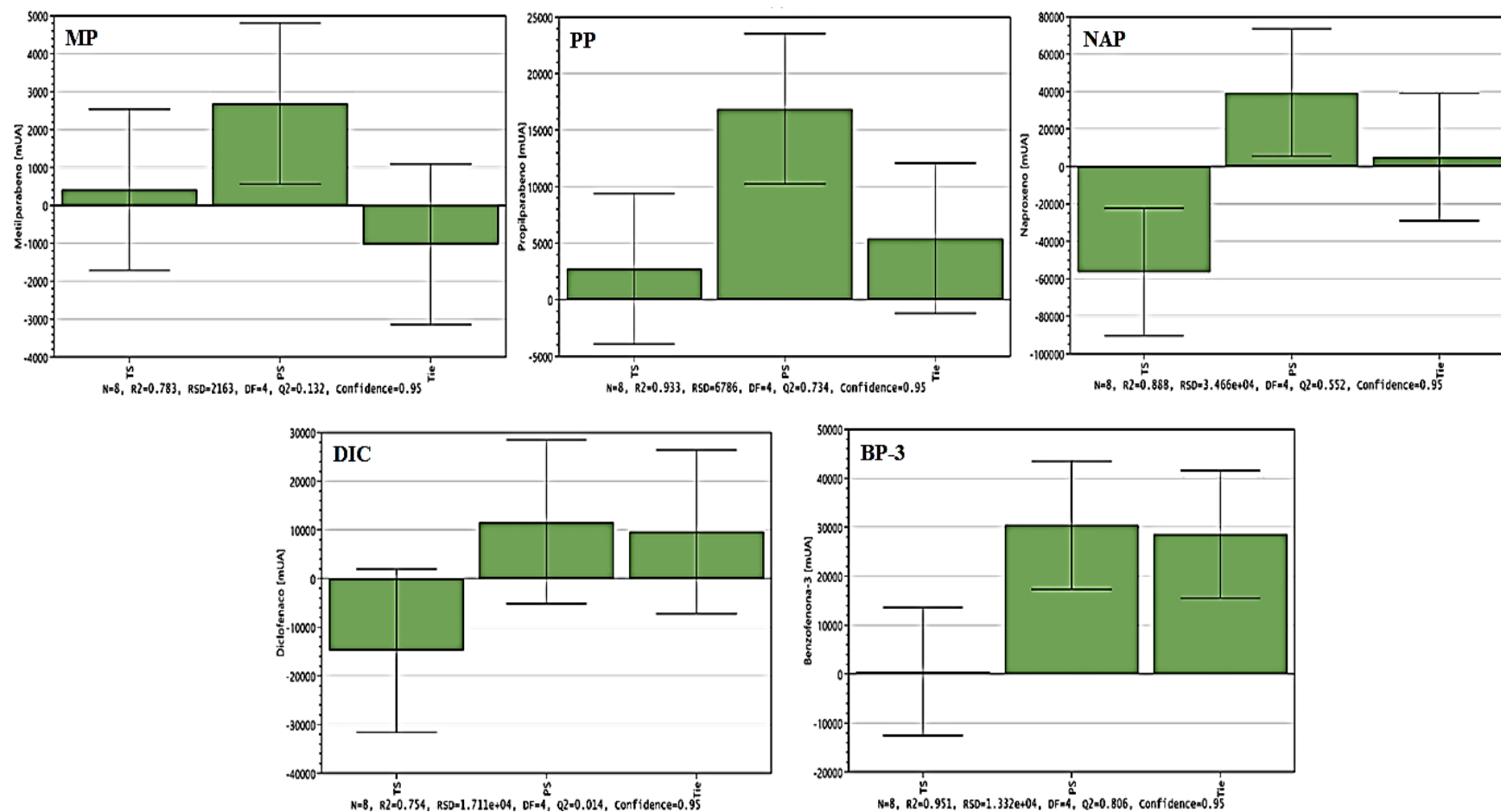


Figura 48. Gráficos de coeficiente escalados y centrados para el efecto estandarizado de los factores tipo de disolvente, proporción de disolvente y tiempo de desorción, evaluados en la optimización de la desorción de los PPCPs estudiados.

Como un primer punto para la optimización de los factores: tipo de disolvente y tiempo de desorción, se realizó una prueba de modelado de dos factores y de estos experimentos se generaron los gráficos de contorno.

Como se puede ver en los gráficos de contorno de la Figura 49, los valores predictivos del factor tiempo para maximizar la respuesta de los analitos estuvieron entre 10 y 30 min. Por otra parte, en cuanto al tipo de disolvente de desorción se encontró que la mezcla de agua/metanol, maximiza la respuesta de MP, NAP y DIC; la mezcla buffer/metanol, maximiza la respuesta de PP; mientras que para BP-3, era indistinto la mezcla utilizada para aumentar la respuesta.

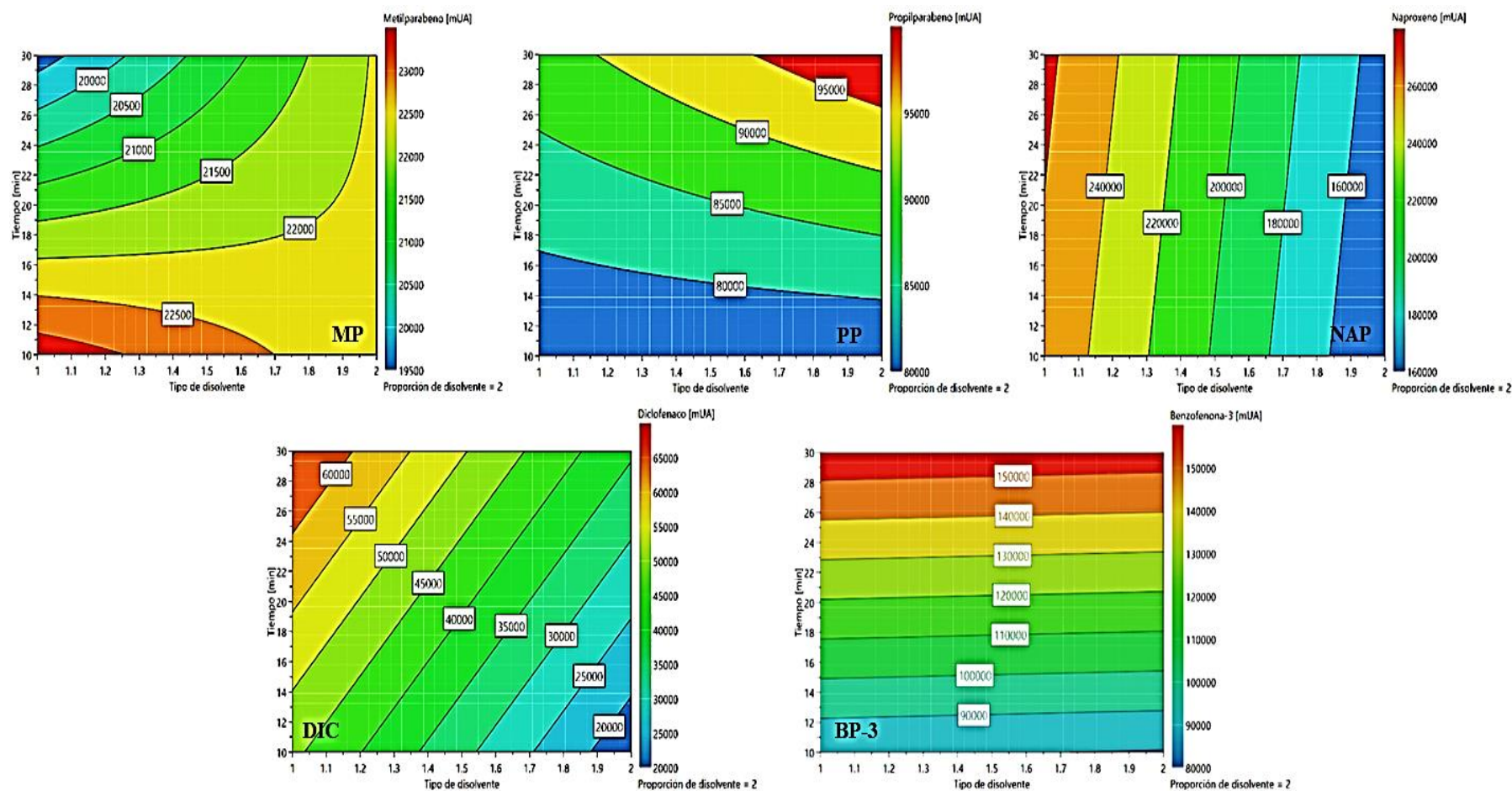


Figura 49. Gráficas de contorno obtenidos para los valores predictivos de tipo de disolvente y tiempo de desorción en la optimización de la desorción de los PPCPs estudiados.

Debido a los resultados anteriores, obtenidos en la prueba de modelado, se decidió optimizar mediante un diseño de factor por factor el tiempo de desorción y el tipo de disolvente, tal y como observa en la Tabla 31, llevándose a cabo 6 ensayos por triplicado realizando un total de 18 experimentos.

Tabla 31. Variables utilizadas en la optimización del tipo de disolvente y el tiempo de desorción.

Factor	Valor		
Proporción de disolvente	70/30		
Tipo de disolvente	Agua/Metanol	Buffer/Metanol	
Tiempo	10	20	30
Volumen de desorción	300 μ L		

En las gráficas de las Figura 50 y 51, se muestran los resultados obtenidos en la optimización del tiempo de desorción y del tipo de disolvente.

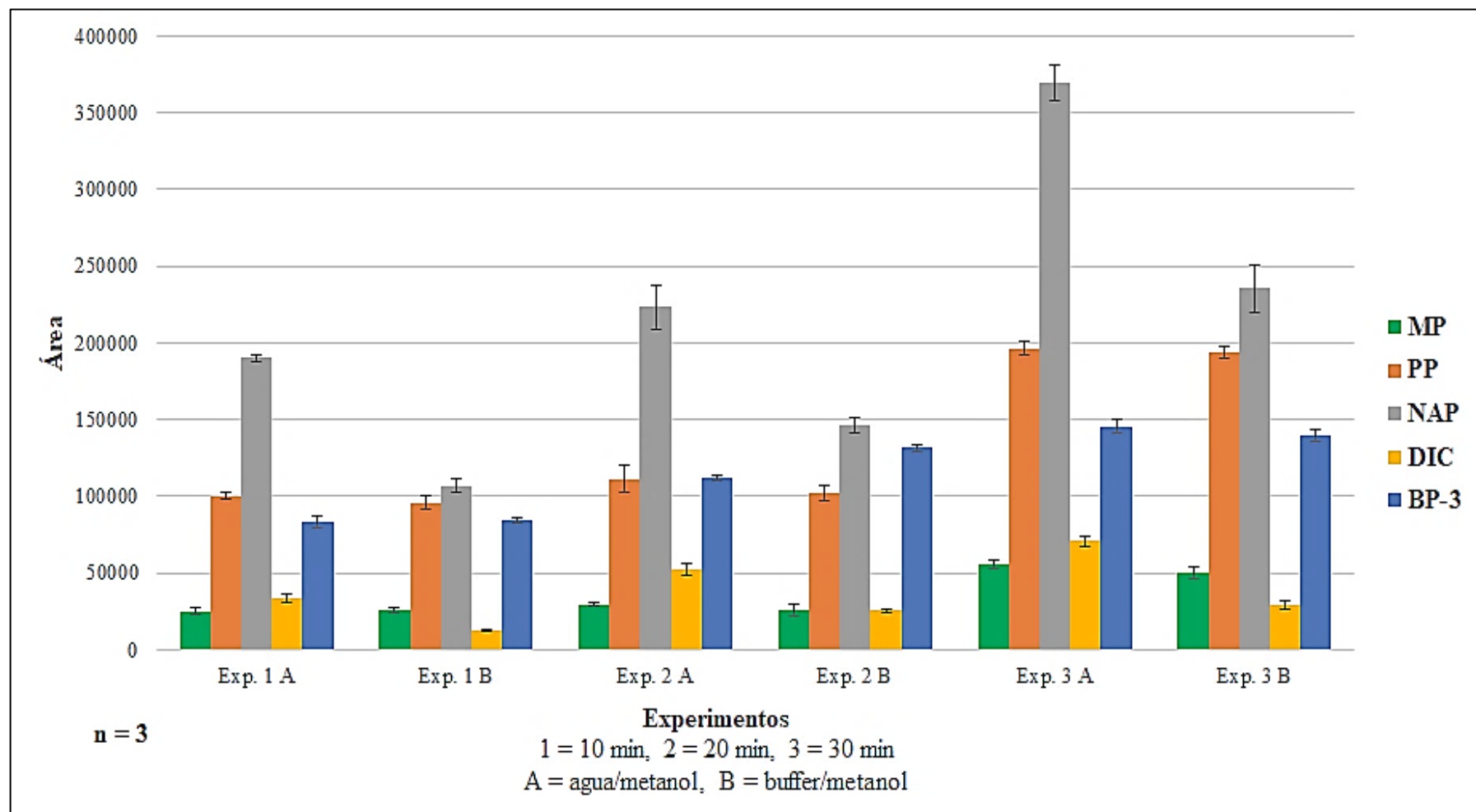


Figura 50. Comparación de la eficiencia de desorción a diferentes tiempos y tipos de disolventes.

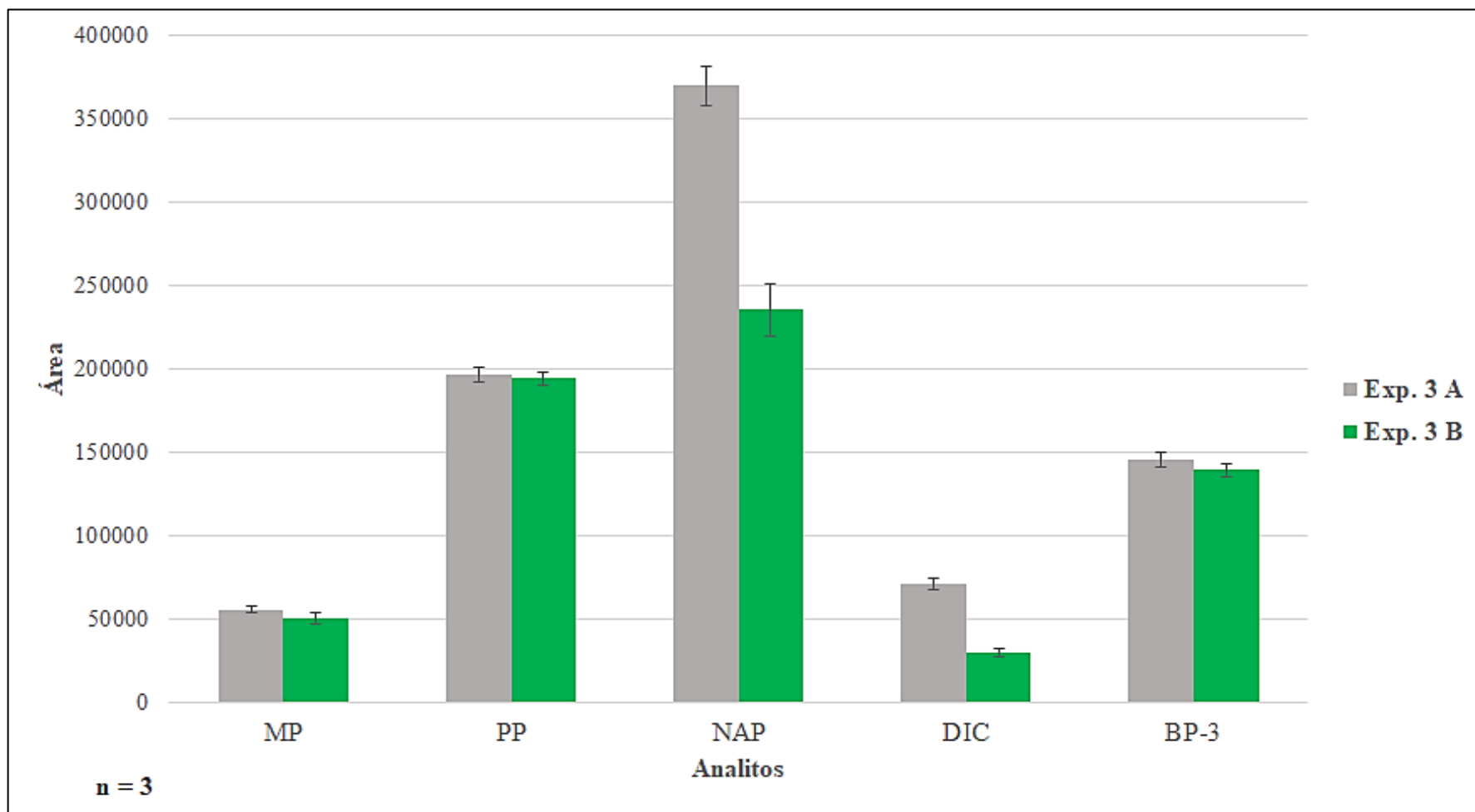


Figura 51. Comparación de la eficiencia de desorción a los 30 minutos (Exp. 3A y Exp. 3B) y diferente tipo de disolvente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ambos procesos de optimización, en la Tabla 32 se enlistan las condiciones óptimas para el método de SPME por inmersión directa desarrollado para el análisis de los PPCPs incluidos en el estudio.

Tabla 32. Condiciones óptimas del método de SPME por inmersión directa para el análisis de los PPCPs incluidos en este estudio.

<i>Extracción</i>	Factor	Valor
	Volumen de muestra	8 mL
	Tiempo	15 min
	Temperatura	Temperatura ambiente
	Agitación	800 rpm
	Fuerza iónica	0 %
<i>Desorción</i>	Tiempo	30
	Tipo de disolvente	agua/metanol
	Proporción de disolvente	70/30
	Volumen de desorción	300 µL

5.9 Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción de diferentes fibras bajo las condiciones óptimas

Se realizaron extracciones a diferentes concentraciones de PPCPs con fibras fabricadas dentro de un mismo y diferente lote, bajo las condiciones óptimas del método de SPME por inmersión directa.

Para las pruebas de eficiencia y reproducibilidad de extracción dentro de un mismo lote; las fibras correspondientes a los Lotes identificados como 1, 2 y 3, fueron evaluadas a las concentraciones de 0.5, 1.5 y 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Por otra parte, para los ensayos de eficiencia y reproducibilidad de extracción entre diferente lote; cada una de las fibras de los Lotes identificados como 4, 5 y 6, fueron evaluadas a las concentraciones de 0.5, 1.5 y 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La Tabla 33 muestra los resultados de reproducibilidad obtenidos en las pruebas realizadas dentro un mismo lote, obteniendo en todos los casos valores de % DER menores a 10 %. De la misma forma, la Tabla 34 muestra los resultados de reproducibilidad obtenidos en las pruebas realizadas entre diferentes lotes, obteniendo en todos los casos valores de % DER menores a 13 %.

También, en la Tabla 33 se pueden ver los resultados obtenidos en el análisis de varianza de las pruebas realizadas dentro un mismo lote, las cuales no presentaron diferencia estadísticamente significativa en la eficiencia de la extracción ($p > 0.05$) de los analitos modelo.

Por otro lado, en la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza de las pruebas realizadas entre fibras de diferente lote, las cuales tampoco presentaron diferencia estadísticamente significativa en la eficiencia de la extracción ($p > 0.05$) de los analitos modelo.

Tabla 33. Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción dentro de fibras del mismo lote.

Fibras	Analito	Promedio	DE	% DER	F_t	F_c	Probabilidad
Lote 1 (0.5 µg mL⁻¹)	MP	7140	146.492	2.052	3.354	0.129	0.879
	PP	29875	2781.918	9.312			
	NAP	41647	1586.213	3.809			
	DIC	14225	438.747	3.084			
	BP-3	43710	3799.718	8.693			
Lote 2 (1.5 µg mL⁻¹)	MP	22894	2038.738	8.905	3.354	0.048	0.952
	PP	78265	3670.525	4.690			
	NAP	147547	3804.584	2.579			
	DIC	50881	2339.758	4.598			
	BP-3	126480	3677.641	2.908			
Lote 3 (3.0 µg mL⁻¹)	MP	44088	3490.279	7.917	3.354	0.016	0.983
	PP	145464	3161.394	2.173			
	NAP	355319	32010.168	9.009			
	DIC	101688	5661.721	5.568			
	BP-3	248836	4933.467	1.983			

Tabla 34. Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción entre fibras de diferente lote.

Fibras	Analito	Promedio	DE	% DER	F _t	F _c	Probabilidad
Lotes 4, 5 y 6 (0.5 µg mL⁻¹)	MP	7375	435.959	5.911	3.101	0.016	0.983
	PP	28499	2620.436	9.195			
	NAP	42105	2184.750	5.189			
	DIC	14377	535.492	3.725			
	BP-3	46038	2471.738	5.369			
Lotes 4, 5 y 6 (1.5 µg mL⁻¹)	MP	22392	2706.319	12.086			
	PP	75500	4752.328	6.294			
	NAP	145627	5645.873	3.877			
	DIC	48848	2951.111	6.041			
	BP-3	125123	6783.604	5.422			
Lotes 4, 5 y 6 (3.0 µg mL⁻¹)	MP	42825	3831.778	8.947			
	PP	140146	3370.110	2.405			
	NAP	358740	12223.705	3.407			
	DIC	104733	4645.606	4.436			
	BP-3	252653	9391.285	3.717			

5.10 Validación del método de SPME por inmersión directa

El método de SPME por inmersión directa desarrollado para la determinación de PPCPs fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, los resultados se presentan en las Tabla 35.

En la Figura 52, se muestra un cromatograma obtenido de una solución estándar de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el cual fue sometido al proceso de extracción bajo las condiciones óptimas del método de SPME por inmersión directa, así como también se muestran los espectros de UV obtenidos para cada uno de los analitos bajo las condiciones evaluadas.

Tabla 35. Resultados de la validación del método de SPME por inmersión directa para el análisis de los PPCPs estudiados.

Analito	Linealidad			Precisión % DER de las respuesta	Exactitud	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Ecuación de regresión	r^2	% DER de los factores de respuesta				
MP 257 nm	$y = 13175x - 4457$	0.996	8.964	1.56 – 3.17	$m = 1.000$ $r^2 = 0.996$	0.046	0.139
PP 257 nm	$y = 51627x - 13123$	0.996	9.360	2.67 – 4.05	$m = 1.000$ $r^2 = 0.996$	0.039	0.118
NAP 232 nm	$y = 177584x - 100889$	0.996	13.413	1.44 – .3.06	$m = 1.000$ $r^2 = 0.996$	0.093	0.279
DIC 280 nm	$y = 25114x + 11643$	0.997	8.232	1.79 – 2.15	$m = 1.000$ $r^2 = 0.997$	0.079	0.237
BP-3 290 nm	$y = 66488x + 31886$	0.998	11.749	0.99 - 2.48	$m = 1.000$ $r^2 = 0.998$	0.023	0.070

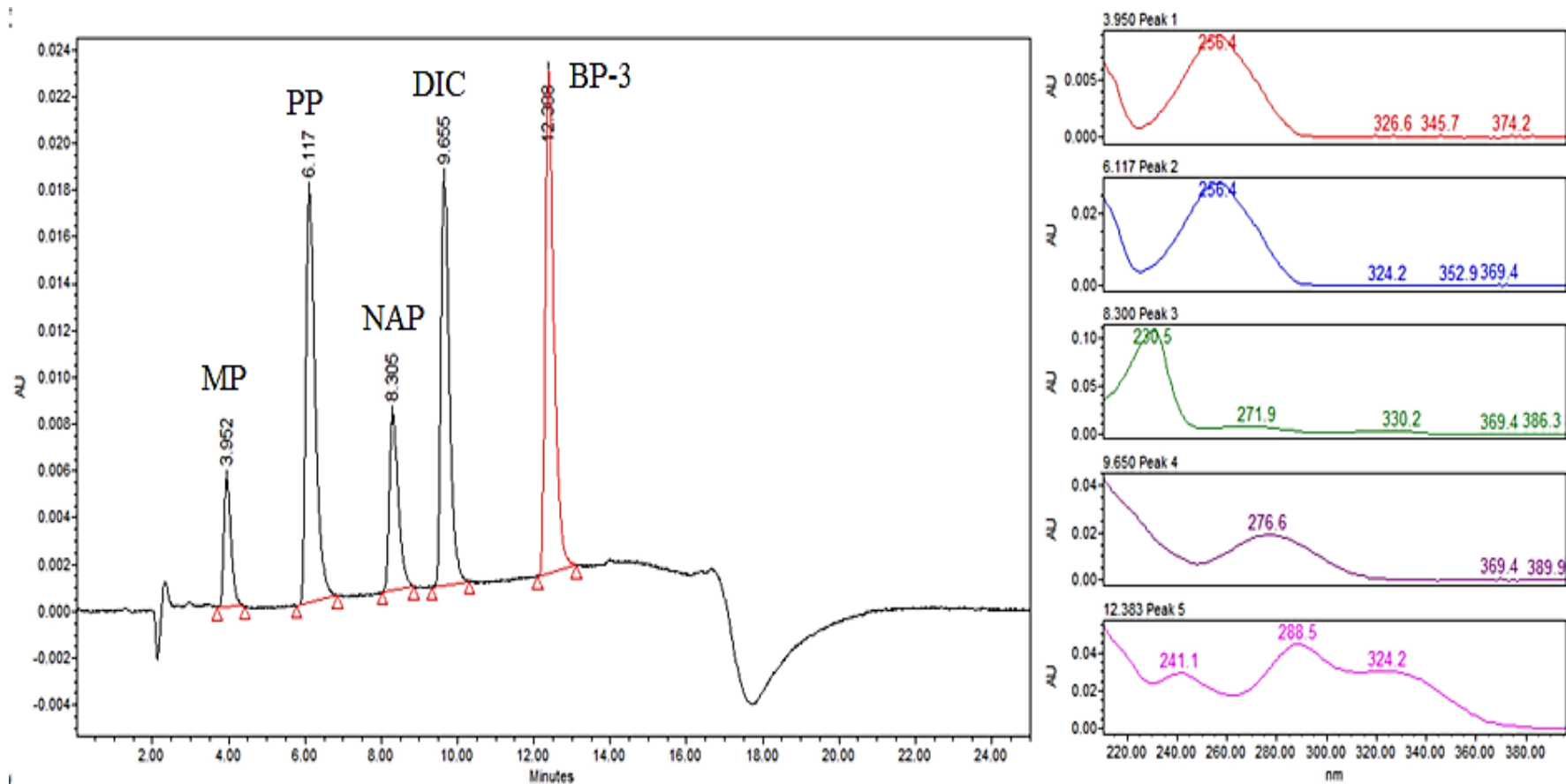


Figura 52. Cromatograma obtenido para la extracción de una solución estándar de PPCPs (10 µg mL⁻¹) en buffer de formiatos 40 mM (pH 4) y metanol (70:30), bajo las condiciones de la Tabla 27. Detección a 270 nm.

5.11 Aplicabilidad del método: análisis de muestras

Siguiendo las condiciones óptimas del proceso de extracción y desorción, se analizaron las 10 muestras recolectadas, estas fueron fortificadas a una concentración de $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MP, PP, NAP, DIC y BP-3, todas las muestras fueron analizadas por triplicado, se calculó el porcentaje de recuperación (% R) y el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) para cada uno de los analitos.

Los resultados obtenidos en cada una de las muestras se resumen en las Tablas 36 y 37.

A manera de ejemplo, en la Figura 53 se muestra un cromatograma obtenido de la extracción de una de las muestras analizadas, así como los espectros de UV obtenidos para cada uno de los analitos.

Tabla 36. Resultados obtenidos de los PPCPs en el análisis de las muestras (M1 – M5).

Analitos	Muestras									
	M1		M2		M3		M4		M5	
	% R	% DER	% R	% DER	% R	% DER	% R	% DER	% R	% DER
MP	118.896	10.693	179.161	4.707	110.888	9.416	114.608	6.581	107.236	4.297
PP	97.542	9.110	154.068	4.228	112.158	11.794	116.638	8.684	104.930	4.025
NAP	52.793	5.247	57.847	3.790	47.567	4.006	45.782	2.567	50.255	2.053
DIC	9.782	14.448	27.421	15.487	19.863	15.774	3.390	16.408	21.518	13.688
BP-3	110.594	13.633	88.012	4.284	86.026	5.863	89.765	6.550	78.890	4.396

Tabla 37. Resultados obtenidos de los PPCPs en el análisis de las muestras (M6 – M10).

Analitos	Muestras									
	M6		M7		M8		M9		M10	
	% R	% DER	% R	% DER	% R	% DER	% R	% DER	% R	% DER
MP	148.158	6.924	104.360	8.748	103.031	5.030	127.843	4.422	183.297	6.952
PP	144.940	1.519	106.815	10.205	102.052	3.697	116.994	6.873	158.371	10.507
NAP	55.725	2.320	48.601	4.404	49.485	1.302	48.786	1.798	55.506	2.179
DIC	35.403	6.412	10.373	15.345	16.901	15.578	3.411	16.596	27.426	13.082
BP-3	92.742	3.368	79.997	4.885	80.357	5.769	67.516	1.608	76.305	6.279

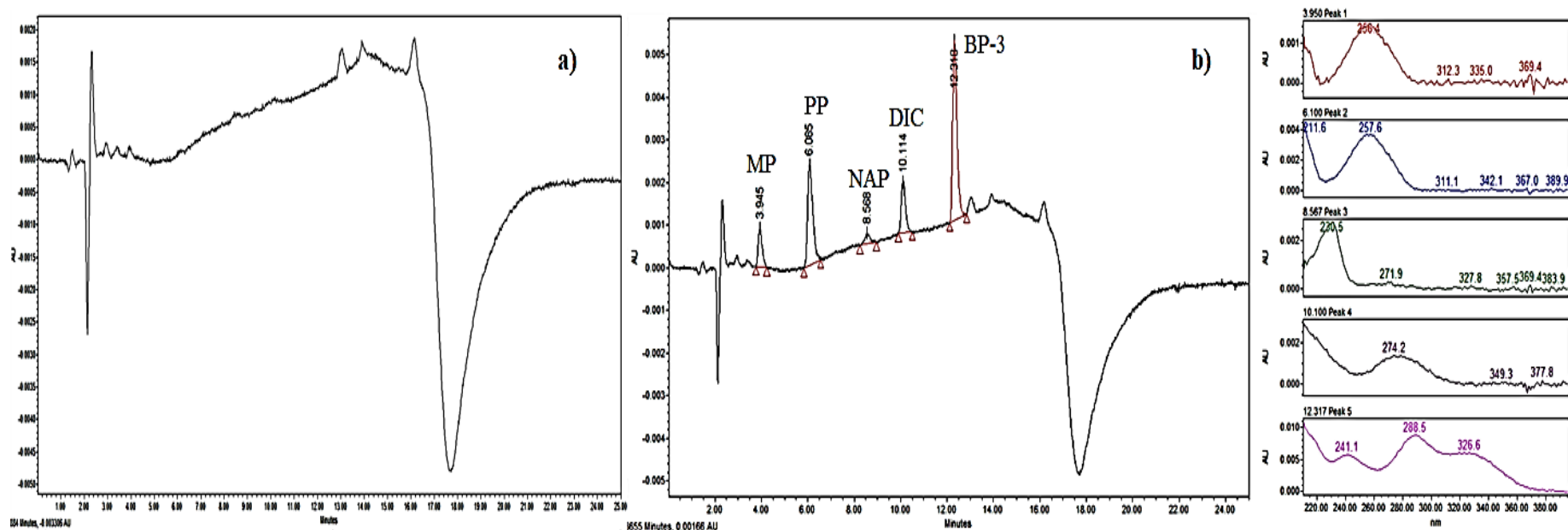


Figura 53. a) Cromatograma obtenido de la extracción de la muestra 1(M1) sin adición de PPCPs y b) Cromatograma obtenido de la extracción de la misma muestra enriquecida a $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PPCPs, bajo las condiciones de la Tabla 27. Detección a 270 nm. Detección a 270 nm.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

6.1 Desarrollo del método cromatográfico

Los compuestos incluidos en este estudio son sustancias ampliamente utilizadas como medicamentos de venta libre y con receta tales como metformina (MET), cafeína (CAF), naproxeno (NAP) y diclofenaco (DIC), conservadores como metilparabeno (MP) y propilparabeno (PP) y los filtros UV como la benzofenona-3 (BP-3) y benzofenona-4 (BP-4). Como puede verse en la Tabla 4, estos compuestos poseen diferentes estructuras químicas, cuyos valores de Log P entre -2.6 y 4.0 nos indican el amplio rango de hidrofiliidad – hidrofobicidad que presentan.

La complejidad de las diversas matrices de las muestras en las que se encuentran los PPCPs, así como las propiedades físicas y químicas que presentan esta gran variedad de compuestos, da como resultado un complicado análisis de los mismos [Ebele et al., 2017]; por lo cual son necesarias técnicas altamente sensibles, selectivas y costosas tales como la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de gases (GC) ambas

acopladas a la espectrometría de masas (MS) [Dévier et al., 2011]. La GC-MS es una técnica robusta y menos costosa, pero la presencia de grupos funcionales polares en algunos de estos compuestos hace necesaria su derivatización para reducir la polaridad y aumentar su volatilidad, lo que genera procedimientos más laboriosos y por consiguiente un mayor consumo de tiempo [Aznar et al., 2016]. Por otro lado, la LC-MS ha permitido el análisis de un mayor número de PPCPs, sin embargo, debido a la diferencia en la polaridad de los PPCPs, los métodos cromatográficos suelen ser por lo general muy largos [Kasprzyk et al., 2008]. Debido a lo anterior, es necesario introducir métodos rápidos y sensibles; que sean capaces de analizar múltiples clases de estos compuestos dentro de una sola corrida analítica y que sean de fácil accesibilidad para la mayoría de los laboratorios de ensayo. Por lo que la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detectores de luz ultravioleta-visible y/o arreglo de diodos, son una buena alternativa para el análisis de estos contaminantes.

Con la finalidad de obtener un método cromatográfico para la determinación simultánea de los analitos modelo, se evaluaron tres columnas de cromatografía en fase inversa con diferente fase estacionaria (Atlantis dC18, Kinetex PFP y Discovery HSF5). Se evaluaron fases móviles empleando una solución amortiguadora de formiatos (40 mM, pH 4) y metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos. Estos disolventes orgánicos se evaluaron con la finalidad de establecer cual de ellos podría favorecer la mejor separación, los cuales fueron seleccionados debido a que existen reportes de su capacidad para formar puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo, respectivamente, lo que podría resultar significativo en la selectividad de la separación [Sun et al., 2006; Le Mapihan et al., 2007]. Sin embargo, se ha reportado que el uso de acetonitrilo como fase móvil favorece picos con menor tiempo

de retención, más estrechos y más simétricos que el metanol en la mayoría de columnas de fase inversa, así como una menor presión en el sistema, pero su costo es más elevado [Manchón et al., 2011].

6.1.1 Métodos desarrollados empleando la columna Kinetex PFP

La fase estacionaria de esta columna está compuesta por grupos pentafluorofenilpropil (PFP), la cual fue seleccionada ya que es una alternativa a las fases convencionales de C18, por su capacidad de retener moléculas de diferentes polaridades y tamaños, debido a que puede presentar interacciones del tipo π - π , hidrofóbicas, dipolo – dipolo, puentes de hidrógeno y algunas interacciones estéricas e intercambio iónico con los analitos [Baba et al., 2014; Euerby et al., 2007].

La columna Kinetex PFP presenta una partícula con la tecnología Core-Shell, es decir, una partícula de sílice no poroso recubierta por una capa de sílice porosa la cual tiene unida químicamente el ligando PFP, lo que incrementa la velocidad de transferencia de masa y disminuye los efectos por la difusión, generando métodos más eficientes en poco tiempo [Hayes et al., 2014].

La evaluación de esta columna, se realizó en el cromatógrafo de líquidos Waters 2695, inicialmente se trabajó con un flujo de 0.15 mL min^{-1} , 35°C , inyectando $3 \mu\text{L}$ del estándar y empleando metanol como modificador orgánico.

Los gradientes evaluados iniciaban con altos contenidos de fase acuosa, esto debido a que la MET es una molécula pequeña, altamente polar ($\log P -2.60$), que presenta una rápida elución en las fases estacionarias de fase inversa tradicionales y requiere fases móviles con un alto contenido de agua para poder obtener tiempos de retención

más prolongados [Chhetri et al., 2014; Truong et al., 2018]. Sin embargo, la MET, no presentó retención aun empleando un alto porcentaje de fase acuosa (90 – 99 %) como se observa en la Figura 7.

Al no poder retener a MET se probó acetonitrilo, iniciando con un 90 % de la fase acuosa con lo que fue posible lograr su retención. Diferentes sistemas de gradiente fueron probados para la separación del resto de los analitos, sin embargo, el que mejor separación mostró presentaba una resolución de 0.94 para el par MP/BP-4, lo que indica una separación no adecuada para su cuantificación [Gary, 2009]. En la Figura 8 se puede observar como la separación de dicho par no es completa.

Yang y colaboradores, mencionan que en las columnas de fase inversa que contienen grupos fenilo en la fase estacionaria se obtienen mejores separaciones con el metanol; porque el acetonitrilo bloquea las interacciones $\pi - \pi$ entre los solutos y los grupos fenilo ligados a la fase estacionaria [Yang et al., 2005]. Una de las razones por lo cual en este trabajo se logró la retención de MET con acetonitrilo, puede ser atribuida a otro tipo de interacciones, como lo reportan West y colaboradores [West et al., 2015], ya que mencionan que la fase estacionaria fluorada muestra capacidad de retención de MET, debido a propiedades de intercambio catiónico, favorecidas por la fase móvil empleada en este estudio.

6.1.2 Métodos desarrollados empleando la columna Atlantis dC₁₈

Para los ensayos de esta columna se trabajó en el Cromatógrafo de Líquidos HP 1100 y se utilizó metanol como modificador orgánico. La columna Atlantis dC₁₈, es una columna de fase inversa con una fase estacionaria capaz de retener compuestos

polares sin mostrar una retención excesiva de compuestos no polares, puede ser usada con fases móviles altamente acuosas, incluso un 100 % [t'Kindt et al., 2008; Käkölä et al., 1996]. Los atributos físicos de la fase estacionaria, tales como el endcapping, el tamaño de los poros de la sílice, la densidad del ligando de la fase unida, el tipo de ligando y la resistencia a la deshidratación (colapso hidrófobo), permiten tener una mejor retención de todos los compuestos [Waters, 2004].

Se probaron flujos de 0.15 y 0.2 mL min⁻¹ con temperaturas de 30 y 40 °C. Para cada una de las condiciones descritas anteriormente distintos sistemas de gradientes fueron evaluados.

Cuando se evaluó el uso de acetonitrilo como modificador orgánico, no fue posible la retención de MET (Figura 9). Por otra parte, cuando se empleó metanol en esta columna se obtuvo una buena retención para compuestos con bajos valores de log P (MET, CAF, BP-4 y MP) empleando altos contenidos de fase acuosa (99 %) en la elución, sin embargo, se encontraron algunas dificultades para separar los compuestos más hidrófobos (es decir, MP, BP-4, DIC y BP-3). Los compuestos del par MP/BP-4 coeluían, mientras que el par DIC/BP-3 mostraron tiempos de retención muy similares. Cuando se probaron cambios más lentos en el gradiente se alcanzó una buena resolución para MP/BP-4, pero la separación de DIC/BP-3 no se logró. Como puede verse en la Figura. 10, el gradiente empleado (Tabla 14) produjo una mejor separación para todos los picos, sin embargo el par DIC/BP-3 ($R_s = 0.93$) siguió mostrando una menor resolución a la deseada para la cuantificación, además de un tiempo total de análisis de 70 min.

6.1.3 Métodos desarrollados empleando la columna Discovery HSF5

Para el desarrollo del método en esta columna se trabajó en un Cromatógrafo HP 11000. Al comienzo del programa de elución se utilizó un bajo contenido de modificador orgánico (5 %), que aumentó linealmente a 85 % en 15 min, manteniéndose 5 min y regresando a 5 % de fase orgánica en 5 min. Bajo estas condiciones, todos los analitos fueron retenidos y separados. Sin embargo, los cromatogramas mostraron una deriva significativa de la línea base, lo que dificulta las integraciones de la señal, especialmente para analitos a niveles de concentración bajos, por lo tanto, el método puede ser menos reproducible y sensible.

Es importante destacar que el orden de elución del par MP/BP-4 fue el mismo en la columna Atlantis dC18 y Kinetex PFP, en ambas el MP eluye antes que la BP-4, mientras que en la columna Discovery HSF5 se obtuvo un orden de elución invertido. Por otra parte, a diferencia de la columna Kinetex PFP, en esta columna la MET si fue retenida empleando metanol como modificador orgánico, una de las razones por la cual su retención puede ser posible es porque se ha reportado que las fases PFP tienen la capacidad de interactuar a través de mecanismos de fase normal y de fase inversa, reteniendo las moléculas bajo mecanismos de adsorción y/o partición [Petruczynik et al, 2015]. Además, los enlaces carbono-flúor del anillo de PFP son muy polares, lo que permite que las moléculas también sean retenidas por interacciones dipolo-dipolo y de tipo iónicas, por lo tanto, es probable que estas situaciones ocurran entre la fase y la MET [West et al., 2015]. Probablemente la diferencia de la retención de la MET utilizando metanol en las dos columnas se debe a la características físicas de cada una de ellas, por un lado la Kinetex posee partícula sólida recubierta con la fase estacionara la cual brinda una área superficial limitada que se manifiesta como una baja retención

y poca capacidad de carga de la muestra, en contraste la columna Discovery que tiene una partícula completamente porosa, lo cual brinda una mayor área superficial y con ello una mayor capacidad de carga de las moléculas [Gritti et al, 2010; Fekete et al. 2011].

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se evaluaron varios programas de gradiente para mejorar la línea base y acortar el tiempo de análisis. En general, la CAF y BP-4 fueron los analitos cuya separación fue más compleja. Un aumento más rápido (7 min) en el contenido inicial de metanol permitió reducir la línea base de los cromatogramas, así como los tiempos de retención de los analitos, excepto para la MET e incluso con esta modificación se pudo separar al par CAF/BP-4. Sin embargo, como era de esperarse se redujeron los tiempos de retención del resto de los analitos y por consiguiente su separación disminuyó.

Por otro lado, un aumento más lento (10 min) en el contenido de metanol y la introducción de un período isocrático más largo de este modificador orgánico produjo una separación aceptable para CAF y BP-4 con un valor de resolución mayor a 2. También se evaluó el efecto de aumentar el porcentaje de metanol hasta un 90 % pero los resultados no fueron satisfactorios, ya que se observó un aumento en la deriva de la línea base del cromatograma. Por lo tanto, en función de estos resultados la mejor opción para el análisis de PPCPs empleando esta columna se resume en la Tabla 15 y la Figura 11 es un ejemplo de un cromatograma obtenido bajo estas condiciones.

Finalmente, el método desarrollado en el cromatógrafo HP 1100 fue trasladado al cromatógrafo Waters 2695 con el motivo de aumentar la selectividad y la sensibilidad del método, ya que este equipo cuenta con un detector de arreglo de diodos. La Figura 12 es un cromatograma obtenido bajo las condiciones probadas.

6.2 Selección del sistema cromatográfico óptimo para el análisis de los PPCPs modelo.

En todas las columnas, se obtuvieron tiempos de retención más largos para los compuestos hidrófobos (coeficientes de partición más altos) que los observados para los compuestos hidrófilos, como ocurre en todas las columnas de cromatografía de líquidos de fase inversa [Jouyban et al., 2011]. Sin embargo, también se observaron algunas diferencias en los comportamientos de retención de los compuestos modelo. Por ejemplo, el orden de elución del par MP/BP-4 fue el mismo en la columna Atlantis dC18 y Kinetex PFP, en ambas el MP eluye antes que la BP-4, mientras que en la columna Discovery HSF5 se obtuvo un orden de elución invertido. En la Tabla 16 se presentan los tiempos de retención de los analitos bajo las condiciones seleccionadas como óptimas en cada una de las columnas evaluadas.

Si bien el sistema cromatográfico desarrollado en la columna Kinetex PFP presentó la capacidad de retener a todos los compuestos estudiados en este trabajo, se descartó debido a la baja resolución encontrada entre el par MP/BP-4 y a la deriva de la línea base. Ya que lo anterior dificulta la correcta cuantificación de los analitos sobre todo en concentraciones bajas. Cabe mencionar que en esta columna fue donde se encontró el sistema cromatográfico con el menor tiempo de análisis (28 min). Por otra parte, en esta columna la MET fue el compuesto que mostró la menor retención, sin embargo, presentó un valor de factor de retención (k) 3 veces superior al encontrado en la columna Atlantis dC18, lo cual indica una mayor retención, mientras que si se compara con el valor arrojado en el análisis realizado en columna Discovery HSF5 estos valores son muy semejantes, indicativo de una retención similar. En cuanto al resto de los analitos, en esta columna fue donde se encontraron los mayores valores de k , es decir,

los analitos BP-4, MP, PP, NAP, DIC y BP-3 permanecen más tiempo en la fase estacionaria, en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil lo cual se traduce en mayores tiempos de elución [Gary, 2009].

Los experimentos en las columnas Atlantis dC18 y Discovery HSF5, se realizaron en el cromatógrafo HP 1100. Como puede verse en la Tabla 16, en ambas columnas se obtuvo una buena resolución para todos los compuestos, excepto para DIC y BP-3 ($R_s = 0.93$) utilizando la columna Atlantis dC18. Aunque las dos fases estacionarias mostraron casi el mismo comportamiento de elución, MET mostró una retención muy baja ($k = 0.27$) en la columna de Atlantis. Esto puede explicarse considerando que la MET es una molécula altamente polar, que se somete a una elución temprana en las fases estacionarias de fase inversa tradicionales. Se debe tener en cuenta que para lograr una separación aceptable para todos los analitos en esta columna, se requirió un gradiente de disolvente lento, lo que resultó en un largo tiempo de análisis, poco más de 1 h. Por otro lado, la fase estacionaria fluorada mostró una mejor capacidad de retención de MET ($k = 0.9$), lo que puede atribuirse a los múltiples mecanismos de retención que puede llevar a cabo esta fase estacionaria [Supelco, 2003]. Dado que con la fase estacionaria fluorada se logró una mejor separación de los analitos en un tiempo de análisis más corto, la columna Discovery HSF5 se consideró la mejor opción para la determinación de los analitos modelo bajo las condiciones de la Tabla 17.

Por lo tanto, con la finalidad de incrementar la sensibilidad y selectividad del método, las condiciones óptimas seleccionadas fueron trasladadas al cromatógrafo Waters 2695, el cual cuenta con un detector de arreglo de diodos, para realizar el análisis de cada una de las moléculas en su longitud de onda de máxima absorción.

6.3 Validación del sistema cromatográfico

Se construyeron tres curvas de calibración por estándar externo, en un rango de concentración de 2 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, las cuales fueron inyectadas al cromatógrafo Waters 2695 y en la Tabla 18 se presentan los resultados obtenidos durante la validación del método cromatográfico seleccionado como óptimo para el análisis de los ocho PPCPs incluidos en el presente trabajo.

Para la linealidad, la asociación entre variables se estableció mediante el método de regresión de mínimos cuadrados, se realizó una inspección visual de los gráficos generados y de acuerdo a lo establecido por la guía de la Eurachem [Magnusson y Örnemark, 2014] se encontró que el método era lineal para todos los analitos, ya que se encontraron valores de $r^2 > 0.99$. Además, los datos en los gráficos de residuales mostraron una distribución normal y se encontraron valores de DER de los factores de respuesta $< 5 \%$ en todos los niveles de concentración evaluados [COFEPRIS, 2017]. La precisión se evaluó utilizando los valores de desviación estándar relativas (% DER) de las respuestas de los picos cromatográficos de todos los niveles de concentración de la curva de calibración. En todos los casos, los valores fueron inferiores al 5 %, lo cual es indicativo de una buena precisión [Magnusson y Örnemark, 2014]. El valor más alto de %DER de las respuestas se encontró para la MET (4.11 %) y puede ser atribuido al ruido que presenta el cromatograma, lo cual dificulta su integración, esto puede deberse a la baja longitud de onda de absorción que presenta el analito y en la cual es analizado [Taylor, 2019].

La evaluación de la exactitud se realizó mediante un análisis de correlación entre la concentración obtenida para cada estándar de calibración utilizando la ecuación lineal

del análisis de regresión y la concentración real de los estándares [Swartz y Krul, 2005; Burke, 2001]. Para todos los analitos, se obtuvieron valores de $r^2 > 0.99$ con valores de pendiente superiores a 0.999, lo cual indica la exactitud del método para todos los analitos.

Finalmente, los LD y los LC se calcularon por medio de 3.3 y 10.0 veces la relación entre la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración, respectivamente, de acuerdo a las ecuaciones 3 y 4. Los valores de LD oscilaron entre 0.316 y 0.632 $\mu\text{g mL}^{-1}$; los valores de LC oscilaron entre 0.950 y 1.916 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Stafiej y colaboradores [Stafiej et al., 2007], reporta el desarrollo y validación de un método para determinar anti-inflamatorios no esteroideos en aguas superficiales por cromatografía de líquidos y detección UV, entre los que se incluyen NAP y DIC, para estos compuestos reportan solo los límites de detección, los cuales estuvieron en rango de 6 – 74 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estos límites son bajos en comparación con los encontrados en el método cromatográfico de este trabajo, sin embargo, hay que destacar que ellos hacen uso de un proceso de tratamiento de la muestra (extracción en fase sólida) antes de la inyección al cromatógrafo, lo cual aumenta considerablemente la sensibilidad de su método.

Por otra parte, Díaz-Álvarez y colaboradores [Díaz-Álvarez et al., 2013] reportan el uso de un proceso de microextracción en fibra hueca para el análisis de parabenos por HPLC-UV en diferentes muestras de agua. Los investigadores reportan límites de detección en un rango de 0.05 – 0.08 ng mL^{-1} para el MP y PP, los cuales también son sustancialmente menores a los alcanzados en el método cromatográfico de este trabajo, debido a que ellos hacen uso de una técnica de preparación de muestra.

Un método de microextracción líquido – líquido basado en líquidos iónicos asistido por ultrasonido seguido del uso de cromatografía de líquidos y detección UV fue

desarrollado para el análisis de benzofenonas en agua de grifo y de río, y reportan para la BP-3 un límite de detección de 0.5 ng mL^{-1} [Zhang et al., 2012]. Dicho límite de detección se encuentra por debajo de lo encontrado en este método, debido también al empleo de la técnica de preparación de muestra en el análisis de las aguas.

Aunque a primera vista los valores tanto de límites de detección como de cuantificación encontrados en el método cromatográfico desarrollado y validado en este trabajo son relativamente elevados, pueden considerarse adecuados teniendo en cuenta que se están comparando los límites de detección y/o cuantificación del método, y los que se obtuvieron en esta parte experimental son los límites instrumentales.

6.4 Fabricación de la fibra de SPME

La fabricación de la fibra se dividió en tres etapas: como primera etapa el desgaste de los soportes de la fibra, posteriormente la obtención de una mezcla homogénea de adhesivo – líquido iónico y por último realizar el recubrimiento del soporte desgastado con la mezcla homogénea obtenida.

6.4.1 Desgaste de los alambres de acero inoxidable

Los soportes metálicos para las fibras de SPME, presentan una buena estabilidad mecánica. El desgaste de dichos soportes metálicos para fabricar fibras de SPME es recomendado ya que la rugosidad y porosidad generada en la superficie del alambre aumenta el área superficial del soporte, brindándole la capacidad de soportar una mayor cantidad de recubrimiento y a su vez una mayor adherencia de este material al mismo [Cui et al., 2015].

El acero inoxidable puede ser susceptible a la corrosión en diversos entornos, como ciertas condiciones ácidas o alcalinas. Algunos de los medios utilizados para corroer la superficie de alambres de ciertas aleaciones han sido soluciones de ácido clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fluorhídrico e incluso bases como el hidróxido de sodio [Dhanapal et al., 2015; Wang et al., 2016]. Basado en esto, en nuestro trabajo se emplearon HNO_3 15 N, NaOH 5 N, HCl 12 N, y HCl 5 N, para el desgaste de los alambres empleados como soporte de las fibras.

Por otro lado, la temperatura afecta la tasa de corrosión o desgaste de los materiales, generalmente acelerándose conforme aumente la temperatura, de tal forma que incluso

el material puede llegar a fracturarse por completo. Por lo que es necesario encontrar el valor de temperatura y el tiempo adecuado para lograr el desgaste deseado sin la pérdida del material metálico [Trépanier y Pelton, 2006; Wang et al., 2015]. Debido a esto y a reportes previos en la literatura se decidió fijar la temperatura de los experimentos a 50 °C y evaluar el desgaste hasta 180 min [Hou et al., 2016; Song et al., 2015].

Al llevar a cabo experimentos tanto con HNO₃ 15 N e NaOH 5 N, no fue posible observar desgaste aparente en ninguno de los alambres al colocarlos bajo el estereoscopio, por lo que estos tratamientos fueron descartados.

Posteriormente, se trataron los alambres con HCl 12 N, presentando desgaste e incremento en la porosidad desde los 10 min en el alambre de 0.12 pulgadas de diámetro y a los 20 min en el alambre de 0.14 pulgadas de diámetro. Sin embargo, después de este tiempo se observó una disminución considerable del diámetro en ambos alambres como se observa en la Figura 16, por lo que se decidió realizar un tratamiento menos agresivo con HCl 5 N.

Después de la inmersión en la solución de HCl 5 N, los alambres presentaron desgaste y porosidad en todos los tiempos evaluados, lo cual era más evidente a partir de los 60 min, como se puede observar en la Figura 17. Por lo tanto, las condiciones seleccionadas para el desgaste de los alambres se muestran en la Tabla 19.

El resto del desarrollo experimental se llevó a cabo con los alambres de 0.12 pulgadas de diámetro debido a que el montaje en las jeringas de plástico era más sencillo, lo cual favorecía su manejo en los experimentos posteriores. En la Figura 18, se muestran electromicrofotografías obtenidas de los alambres de 0.12 pulgadas de diámetro antes y después del tratamiento indicado, como puede observarse en las imágenes el

tratamiento originó un desgaste del material metálico evidenciado por la presencia de rugosidad y porosidad en la superficie del alambre.

El desgaste de los alambres fue logrado con un ácido menos corrosivo en comparación con el HF reportado por Kang y colaboradores, aunque el tiempo del tratamiento fue más prolongado [Kang et al., 2015]. Además, el uso del HF puede ser peligroso para el analista e incluso este ácido puede atacar al material de laboratorio [McKee et al., 2014].

El tiempo establecido como adecuado para el desgaste de los alambres fue de 60 min, sin embargo, Cui y colaboradores [Cui et al., 2015] y Yang y colaboradores [Yang et al., 2019], reportan tiempos de desgaste de 20 y 15 min, respectivamente, los cuales son menores a los elegidos en este trabajo, pero en ambos casos hacen uso del ácido fluorhídrico como solución de desgaste.

Por otra parte, Hou y colaboradores [Hou et al., 2016], llevaron a cabo el desgaste de los soportes metálicos de fibras de SPME mediante inmersiones en soluciones de HCl 1M durante 12 h, sin reportar si lo llevaron a cabo a alguna temperatura específica. En comparación con la metodología empleada en el presente trabajo, en ambos se utilizó el mismo ácido solo que a diferente concentración y con distinto tiempo de desgaste. Los autores mencionados anteriormente llevaron a cabo el desgaste a un tiempo más prolongado (12 h), mientras que en este trabajo el tratamiento fue de 1 h, esto puede deberse a que la concentración del ácido utilizado por ellos es más baja que la empleada en este desarrollo experimental, y además, a que probablemente la temperatura empleada (50 °C) fue más alta que la utilizada por los investigadores, ya que al no reportarla se asume que llevaron a cabo sus experimentos a temperatura ambiente o temperatura del laboratorio.

6.4.2 Selección del adhesivo para formar la mezcla de recubrimiento

Para obtener la mezcla homogénea para el recubrimiento se probó la solubilidad de los adhesivos evaluados como posibles candidatos para formar el recubrimiento en diferentes disolventes y su miscibilidad con el líquido iónico. Los disolventes empleados fueron diclorometano, acetona, tolueno y hexano. La solubilidad de los adhesivos en disolventes fue probada ya que en diversos reportes se menciona el uso de estas sustancias junto a la mezcla de líquido iónico/adhesivo, ya sea para mejorar su solubilidad o brindarle mejores características a la mezcla de recubrimiento [González-Álvarez et al., 2013; Kang et al., 2015]. En la Tabla 20, se muestran los resultados obtenidos en las distintas condiciones evaluadas, así como también se muestra la cantidad de disolvente utilizada.

El adhesivo Silicón F101 Sista resultó ser insoluble en los disolventes evaluados, por lo que fue descartado. La mayoría de los adhesivos fueron solubles en diclorometano, solo el Cemento Amarillo y el Pegamento Total Tech en tolueno. Mientras que la solubilidad del Nafion 117 no se evaluó, ya que fue aplicado directamente sobre el soporte debido a su poca viscosidad, como se realizó en reportes previos [Hsieh et al., 2006; Huang et al., 2009].

Posteriormente se probó la miscibilidad de los diferentes adhesivos con el DMIM-BF₄ para evaluar si ambas sustancias eran capaces de formar una mezcla homogénea antes de ser puesta sobre el alambre desgastado, en la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos. De estas pruebas se obtuvo que los adhesivos Cemento Amarillo, Pegamento Total Tech, Sylgard 184 y Sylgard 170 al ponerse en contacto con el líquido iónico no formaban mezclas homogéneas, e incluso se formaban grumos o precipitados como en el caso del Cemento Amarillo, por lo que estos materiales fueron

descartados como posibles candidatos para formar el recubrimiento de la fibra. Debido a lo anterior, el desarrollo del recubrimiento se continuó con el Nafion 117, Silicón Pelikan y el UHU.

6.4.3 Recubrimiento de los alambres desgastados

Una vez seleccionados los adhesivos que formarían parte de la fase extractante de la fibra, se procedió a recubrir el soporte. El método empleado para conseguir el recubrimiento en el alambre fue el de inmersión – aglutinación, el cual consiste en sumergir el material a recubrir en la mezcla de recubrimiento durante varios ciclos con diferentes tiempos de duración, hasta obtener la película deseada [Shi et al., 2016; Pang et al., 2018].

Bajo este procedimiento se pudo observar que el Nafion 114, en todos los ciclos evaluados se escurría del soporte metálico, como se puede ver en la Figura 19, por lo que fue eliminado del desarrollo experimental. Los resultados obtenidos con el Nafion no concuerdan con lo reportado por Hsieh y colaboradores [Hsieh et al., 2006], ya que ellos mencionan que el realizar un pre-recubrimiento con Nafion permite obtener películas más uniformes al trabajar con fibras de sílice y mencionan que la uniformidad de la película puede deberse a las interacciones electrostáticas entre la sílice, el Nafion y el líquido iónico; en ese trabajo fueron empleadas como soporte alambres de acero inoxidable, esto puede ser la razón por la cual no se obtuvieron los resultados esperados.

Por otra parte, se sabe que las fibras de sílice son frágiles, por lo que se han fabricado fibras de soporte metálico con recubrimiento en base a Nafion y nanotubos de carbono,

en donde se hace uso de las propiedades electroconductoras del Nafion y de la capacidad de interaccionar con los nanotubos de carbono, los cuales también son electroconductores, basandose en estas propiedades el recubrimiento construido por Zeng y colaboradores [Zeng et al., 2010], el cual era controlado por la aplicación de voltaje, presentó una buena uniformidad, estabilidad y gran capacidad sorbente, lo cual difiere a lo encontrado en nuestro trabajo, ya que no se pudo retener al Nafion en la superficie del alambre, probablemente porque no se aplicó voltaje, por las existencia de pocas o débiles interacciones entre el soporte y el Nafion, y además a que la fuerza de gravedad permitía el escurrimiento de dicho material debido a su densidad y baja viscosidad.

La mezcla formada por el DMIM-BF₄ y el Silicón Pelikan, fue capaz de formar una película sobre el alambre en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, el recubrimiento formado con 3 inmersiones con duración de 1 min fue visualmente el más homogéneo, como puede verse en la Figura 20. Por otro lado, la mezcla de DMIM-BF₄ con UHU, también fue capaz de formar una película sobre el alambre, siendo el procedimiento de 3 inmersiones con duración de 30 segundos cada inmersión, el método que originó un recubrimiento aparentemente más homogéneo. Sin embargo, se observó la formación de una gota en la parte distal del alambre. Como se mencionó anteriormente la adición de algún disolvente en las mezclas de líquido iónico/adhesivo favorecen algunas características de las mismas, por ejemplo, una disminución en la viscosidad [González-Álvarez et al., 2013; Kang et al., 2015], por lo que al observar esta gota en el extremo distal se decidió añadir diclorometano a la mezcla. El alambre se recubrió con la mezcla formada por el DMIM-BF₄, el UHU y el diclorometano, este último se evapora en el proceso de secado, dejando una película mucho más uniforme en la que el recubrimiento no sufría escurrimiento y por lo tanto no formaba la gota

observada cuando la mezcla no contenía disolvente, como se puede ver en la Figura 21. De igual forma, Meng y colaboradores [Meng et al., 2011] y Amini y colaboradores [Amini et al., 2011], añadieron a las mezclas de recubrimiento acetona y diclorometano, respectivamente, con el objetivo de obtener fibras con recubrimientos más homogéneos y delgados, como se hizo en este trabajo.

Las condiciones óptimas de recubrimiento para los alambres son las que se muestran en la Tabla 22 incluyendo los ciclos de inmersión y el tiempo de duración de estos para cada una de las mezclas.

En todos los casos se recubrió 1.4 cm de la zona de desgaste de cada alambre, posteriormente se secaban por 1 h a temperatura ambiente y después se ponían a secar en la estufa durante 30 min a 40 °C. Las condiciones de desecado fueron seleccionadas en base a reportes previos y a la estabilidad reportada del adhesivo. Con la finalidad de eliminar los solventes residuales resultantes del proceso de recubrimiento [Graham et al., 2011], se decidió llevar a cabo el secado a temperatura ambiente por 1 h, y para acelerar el curado del adhesivo se prosiguió con el secado a 40 °C por 30 min, cabe destacar que a exposiciones por arriba de 70 °C el adhesivo empieza a perder estabilidad [UHU GmbH & Co].

6.4.4 Recubrimiento de los fragmentos de sílice

Otro de los materiales que se ha reportado como soporte de nuevas fibras de SPME ha sido la sílice fundida [Huang et al., 2009; Amini et al., 2011 y Ho et al., 2012]. Tomando en cuenta estos reportes, se decidió probar fragmentos de sílice tratados con NaOH para activar los grupos silanol de la sílice y también se probaron fragmentos sin

tratar con NaOH. Las condiciones evaluadas fueron las seleccionadas para el recubrimiento con el pegamento UHU. Como puede verse en los incisos a y b de la Figura 22 en ningún caso fue posible obtener un recubrimiento uniforme de los fragmentos de sílice, por lo que este soporte fue descartado. He y colaboradores [He et al., 2009] desarrollaron exitosamente una fibra de SPME utilizando como soporte una fibra de sílice recubierta con el líquido iónico bis(trifluorometan)sulfonilimida de 1-etoxietil-3-metilimidazolio y un elastómero de silicón, dichos compuestos presentaban la capacidad de entrecruzarse y eran depositados sobre la superficie de la fibra de sílice desnuda. La capacidad de entrecruzamiento de ambas sustancias y las interacciones con la fibra, les permitió permanecer depositados sobre la superficie de esta, obteniendo fibras hasta con un espesor de 50 μm . En este trabajo, no se logró recubrir a las fibras de sílice, probablemente debido a que tanto el adhesivo como el líquido iónico son distintos a los empleados por He y colaboradores y, puede ser que los materiales evaluados (líquido iónico, adhesivo, fibra de sílice) no presenten fuertes interacciones entre ellos.

6.5 Caracterización de la fibra de SPME

Una vez generado el recubrimiento, se caracterizó morfológicamente mediante la determinación de la uniformidad y espesor, su caracterización por Espectroscopía de Infrarrojo para determinar los grupos funcionales presentes y el análisis elemental por Microscopía Electrónica de Barrido con Detector de Energía Dispersiva de Rayos X. Por otra parte, se evaluó su estabilidad en diferentes disolventes, soluciones con distintos valores de pH y se determinó la capacidad de extracción de la fibra.

6.5.1 Uniformidad y espesor del recubrimiento

Las fibras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido con el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución y poder evaluar las características de la película formada sobre el soporte metálico.

En la Figura 23, se muestran imágenes de las zonas evaluadas de la fibra fabricada con Silicón Pelikan, en donde se puede ver que el recubrimiento no era uniforme, ya que presenta 2 zonas con distinto espesor. La primera zona con un espesor promedio de 5.72 μm y la otra zona presentaba un espesor promedio de 8.49 μm .

De igual manera se evaluó la fibra de UHU, en la cual se pudo ver que el recubrimiento si era uniforme, ya que solo se distingue una zona de recubrimiento con un espesor promedio de 7.12 μm . En la Figura 25, se muestran imágenes obtenidas del recubrimiento de esta fibra.

Shi y colaboradores desarrollaron un recubrimiento en base al líquido iónico trifluorofosfato de tris(pentafluoroetilo) y mencionan que no fue posible determinar el

espesor del recubrimiento debido a la forma líquida que posee el líquido iónico aun en la superficie del alambre [Shi et al., 2016]. Contrario a ellos, en este trabajo si fue posible medir el espesor del recubrimiento, debido probablemente a la presencia del adhesivo como parte del recubrimiento; el cual le confieren mayor adherencia al soporte metálico. Como se mencionó anteriormente, He y colaboradores [He et al., 2009] desarrollaron un recubrimiento a base de líquidos iónicos y un elastómero de silicón que presentó un espesor de 50 μm , es importante destacar que el espesor conseguido por estos autores fue mayor al conseguido en este trabajo. La diferencia se puede deber a las características físicas y químicas que presenta el elastómero de silicón, como lo es una mayor viscosidad, ocupar un mayor volumen, entre otras.

El espesor del recubrimiento es uno de los factores que afectan la eficiencia de la extracción y depende del material empleado y del proceso de recubrimiento llevado a cabo para fabricar la fibra de SPME. El espesor esta directamente relacionado con la cantidad de analito extraído [Spietelun et al., 2013]. Cuando se fabrican nuevas fibras, se busca encontrar aquella en la que el recubrimiento sea lo más uniforme posible, para obtener resultados reproducibles. Si se utiliza una fibra con disitindos espesores en el recubrimiento, la cantidad de analito extraído puede variar considerablemente entre distinsas fibras e incluso dentro de una misma fibra; porque el proceso de extracción no se lleva a cabo de la misma manera en todo el recubrimiento [Hu et al., 2009; Aziz et al., 2014].

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la microscopía electrónica en cuanto a la uniformidad y espesor de la película, se decidió seleccionar a la fibra de UHU para continuar con el resto del desarrollo experimental, a pesar de que la fibra fabricada en base al Silicón Pelikan presentara un mayor espesor de recubrimiento, lo cual en teoría representa una mayor cantidad de analito extraído, sin embargo, era menos uniforme.

Además, en experimentos posteriores se optó por recubrir 2 cm de la zona de desgaste de los alambres desgastados, con la finalidad de aumentar la cantidad y área de recubrimiento de la fase extractante en la fibra. Por lo tanto, las condiciones para llevar a cabo este procedimiento son las se encuentran enlistadas en la Tabla 24.

6.5.2 Caracterización del recubrimiento seleccionado por

Espectrofotometría de Infrarrojo

Los espectros de IR del recubrimiento y de cada uno de los componentes fueron obtenidos y comparados con espectros reportados en la literatura. Los espectros de ambos materiales y del recubrimiento mostraron bandas únicas y también compartían algunas, lo que indica la presencia de estructuras químicas similares en su composición.

El UHU es un adhesivo compuesto a base de acetato de polivinilo y nitrato de celulosa [Down et al., 1996], como bandas características y fácilmente distinguibles, se pueden mencionar las que aparecen aproximadamente entre $1720 - 1750 \text{ cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento simétrico del enlace C=O (del éster), la banda que aparece entre $1210 - 1250 \text{ cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento C-O del éster y la banda que aparece entre $1010 \text{ y } 1030 \text{ cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento C-O (CH-O), por otra parte, aparecen las bandas entre $1300 - 1375 \text{ cm}^{-1}$ y $750 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, del estiramiento NO_2 y las bandas correspondientes al estiramiento $\text{R-O(-NO}_2\text{)}$, respectivamente, ambas procedentes de la celulosa [Noake et al., 2017; D'Amelia et al., 2016]. Un ejemplo de los espectros obtenidos para el UHU es el que se muestra en la Figura 27a.

Por otra parte, el líquido iónico DMIM-BF₄ presenta bandas características entre 3100 y 3200 cm⁻¹, debido a los estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C-H del anillo imidazolio, y la banda ancha que aparece entre 1000 y 1100 cm⁻¹, la cual corresponde a las interacciones del anión con la radiación [Yamada et al., 2017; Buffeteau et al., 2010; Jeon et al., 2008]. Un ejemplo de los espectros obtenidos para el DMIM-BF₄ es el que se muestra en la Figura 27b.

Ambas sustancias muestran en sus espectros bandas similares. Por ejemplo, las bandas que aparecen entre 2800 y 3000 cm⁻¹, debido a los estiramientos de los enlaces C-H de las cadenas alifáticas de ambas sustancias y la banda que aparece entre 1000 y 1100 cm⁻¹, la cual corresponde al solapamiento de las bandas del anión del líquido iónico y la banda estiramiento C-O (CH-O) del adhesivo que aparece entre 1010 y 1030 cm⁻¹. El UHU presenta como banda más característica la que se encuentra entre 1720 – 1750 cm⁻¹, mientras que para el líquido iónico las bandas presentes por arriba de los 3000 cm⁻¹ son las más distintivas de esta sustancia.

En la Figura 27c, se muestra un espectro obtenido del recubrimiento generado sobre el alambre con la mezcla del UHU y el DMIM-BF₄; como puede verse se observan señales características correspondientes a ambos compuestos, lo que indica que el recubrimiento efectivamente está compuesto por una mezcla de ambas sustancias.

6.5.3 Análisis elemental del soporte metálico antes y después del recubrimiento

Un parámetro que se ha estado utilizando para caracterizar la composición elemental de la superficie de las nuevas fibras, es el análisis elemental por medio de espectros de

dispersión de energía de rayos X obtenidos con ayuda del microscopio electrónico de barrido, este parámetro ayuda a determinar la presencia del recubrimiento sobre el metal [Zhen et al., 2016].

La Figura 28 muestra una imagen del área del soporte metálico desgastado sin recubrimiento en donde se llevó a cabo el análisis elemental, así como también un espectro de energía dispersiva de rayos X del análisis, en donde se puede ver que los elementos detectados fueron: Si, Cl, Ca, Cr, Mn, Fe y Ni, estos elementos claramente ponen en manifiesto que se trata de los elementos que componen la aleación del metal, a excepción de Cl, que puede deberse a un residuo del ácido que se usa para atacar el material metálico [Filho et al., 2011].

Por otra parte, en el espectro de la Figura 29 se observa la presencia de la mayoría de los elementos de la figura anterior (Si, Cr, Mn, Fe y Ni) y además se observa la aparición de C, lo cual indica la presencia del material orgánico del recubrimiento sobre el metal [Li et al., 2015].

6.5.4 Estabilidad del recubrimiento frente a distintos disolventes y soluciones con diferentes valores de pH.

Se realizaron pruebas de estabilidad de la fibra fabricada al sumergir parte del recubrimiento (1 cm aproximadamente) en agua desionizada, y en mezclas de agua desionizada con metanol o acetonitrilo en proporciones de 5 al 20 %.

La Figura 30a y 31a son ejemplos de cromatogramas obtenidos para las mezclas de DMIM-BF₄-metanol y DMIM-BF₄-acetonitrilo, respectivamente, y de acuerdo a los

datos obtenidos, en ninguno de los experimentos se pudo determinar la presencia de líquido iónico en las soluciones de prueba (ejemplos, Figuras 30b y 31b).

También se llevaron a cabo inmersiones de la fibra fabricada en soluciones amortiguadoras de pH 3 y pH 9. Los resultados obtenidos en cuanto a la estabilidad de la fibra en estas condiciones, muestran que el recubrimiento se pierde al estar en contacto con las diferentes soluciones de ambos valores de pH (Figura 32b y Figura 33b), además, se observó que conforme aumentaba el número de inmersiones realizadas con la misma fibra, disminuye la señal del líquido iónico presente en las diferentes soluciones, lo cual puede ser indicativo de una posible pérdida del líquido de manera progresiva.

Como puede observarse en la Tabla 2, la mayoría de las fibras desarrolladas por medio de la metodología de inmersión – aglutinación, han sido aplicadas para análisis por HS-SPME, por lo que no ha sido necesario evaluar la durabilidad de la fibra tras la inmersión en diferentes soluciones. Los estudios que se centraron en DI-SPME, no reportan estudios de estabilidad de la fibra en diferentes disolventes [Shi et al., 2016; Cui et al., 2015], sin embargo, mencionan la pérdida de la eficiencia en la extracción tras cierto número de extracciones realizadas.

Una de las limitaciones de las fibras de SPME es la resistencia física y química del recubrimiento, la cual está ligada a la vida útil de la misma. No todos los recubrimientos resisten a las mismas condiciones (disolventes, matrices de muestra, temperatura, etc). El haber encontrado que ocurría una pérdida progresiva del líquido iónico al sumergir la fibra desarrollada en las diferentes soluciones de pH, nos dice que la vida útil de la fibra es corta, presenta poca durabilidad.

6.5.5 Capacidad de extracción del recubrimiento seleccionado

Para evaluar la capacidad de extracción de la fibra fabricada, se realizaron extracción a soluciones estándares de los PPCPs modelos a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ empleando fibras recubiertas únicamente con UHU y fibras recubiertas con DMIM-BF₄ + UHU.

La Figura 34 muestra un cromatograma obtenido para la extracción de un estándar de PPCPs con una fibra recubierta solo con UHU y como puede verse presenta la capacidad de extraer solo a los analitos MP, PP, NAP, DIC y BP-3. De igual manera, las fibras recubiertas con la mezcla de líquido iónico DMIM-BF₄ y el adhesivo UHU mostraron poseer capacidad de extraer a los mismos compuestos (MP, PP, NAP, DIC y BP-3), como puede verse en el cromatograma de la Figura 35.

Con las fibras recubiertas con la mezcla de DMIM-BF₄ + UHU se obtuvo una mayor recuperación de los compuestos extraídos, es decir, las áreas de los picos cromatográficos fueron superiores a las encontradas con las fibras recubiertas solo con el UHU. Al graficar y comparar los resultados obtenidos con ambas fibras, se pudo ver como la presencia del líquido iónico en el recubrimiento incrementa la capacidad de extracción de la fibra desarrollada (Figura 36). Esto concuerda con lo reportado por He y colaboradores [He et al., 2009], ellos desarrollaron un fibra con recubrimiento a base de un elastómero de silicón y el líquido iónico bis(trifluorometan)sulfonilimida de 1-etoxietil-3-metilimidazolio para la extracción de anfetamina y metanfetamina de muestras de orina, y al comparar la eficiencia de extracción de fibras recubiertas con el elastómero y fibras recubiertas con la mezcla de elastómero y líquido iónico, observaron que la presencia de líquido iónico incrementó hasta 7 veces la cantidad de analito extraído.

El recubrimiento de la fibra desarrollada en este trabajo, está conformado por una mezcla del adhesivo UHU, el cual consta de acetato de polivinilo y nitrato de celulosa y el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, cabe mencionar que no se ha encontrado algún reporte en donde este líquido iónico haya sido empleado como recubrimiento en fibras de SPME. La imagen de la Figura 54, muestra las estructuras químicas de los componentes del recubrimiento.

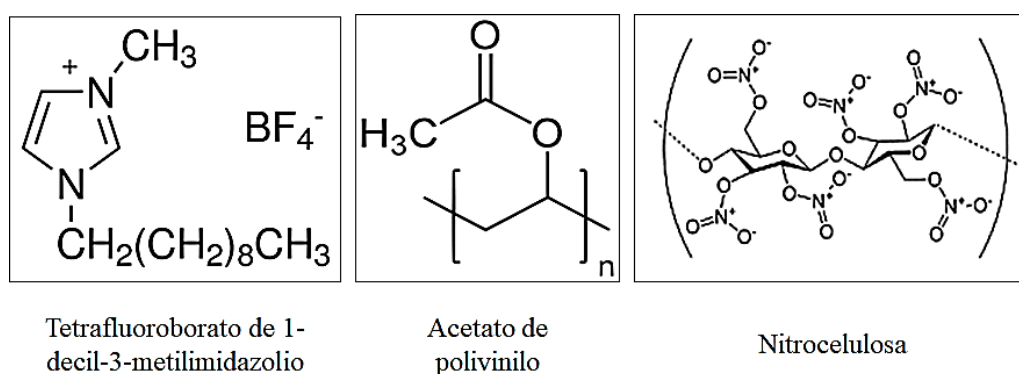


Figura 54. Estructuras químicas de los componentes de la fase extractante.

Los mecanismos de enriquecimiento en la extracción, están estrechamente relacionados con las interacciones entre los materiales de recubrimiento y los analitos, así como con la microestructura y la composición de los materiales de recubrimiento y los analitos [Zheng et al., 2018].

Las interacciones que pueden presentarse entre los componentes del adhesivo y el líquido iónico son del tipo iónicas por las cargas inherentes del líquido iónico y de la nitrocelulosa, e hidrofóbicas por las cadenas alquílicas que ambos poseen. Estos materiales pueden presentar muchos tipos de interacciones, dependiendo de los analitos a los que se expongan [Canongia Lopes et al., 2006].

Los líquidos iónicos poseen estructuras muy diversas, pudiendo presentar interacciones dispersivas, puentes de hidrógeno, $\pi - \pi$, dipolo y iónicas. En general, el

anión tendrá mayor efecto sobre la formación de enlaces de hidrógeno, mientras que el catión será responsable de interacciones del tipo hidrofóbicas. Si es sustituido, como en este caso por los anillos imidazolio, las interacciones $\pi - \pi$ serán las responsables de la retención, sobre todo de moléculas con anillos aromáticos ricos en electrones [Anderson et al., 2002]. Esto puede ser lo que ocurra con las moléculas estudiadas en este trabajo, ya que todas poseen anillos aromáticos, pueden formar puentes de hidrógeno y de acuerdo al pH pueden estar ionizadas, por lo que también pueden presentar interacciones iónicas con el recubrimiento. Sin embargo, probablemente las interacciones que prevalezcan o gobiernen el proceso de extracción del recubrimiento desarrollado sean las del tipo hidrofóbicas porque son más las cadenas alquílicas del líquido iónico y del adhesivo que los otros grupos funcionales que dichos componentes poseen en su estructura, es por eso que los analitos más favorecidos en la extracción son los que poseen los mayores valores de log P. De los ocho analitos estudiados, los cinco extraídos (MP, PP, NAP, DIC y BP-3) son los más hidrofóbicos ya que presentan valores de log P entre 2.90 a 4.00.

La fibra desarrollada tiene un recubrimiento conformado por el líquido iónico DMIM-BF₄, dicho líquido iónico en trabajos previos dentro del grupo de investigación demostró tener la capacidad de extraer compuestos altamente hidrofílicos. En la tesis de maestría Portillo Castillo [Portillo Castillo, 2013] empleó este líquido iónico en la extracción micelar de acrilamida (log P = -0.67), cafeína (log P = -0.7) y ácido salicílico (log P = 1.96) pudiendo obtener recuperaciones en un rango de 39.46 a 120 %. Por otra parte, Garza Tapia [Garza Tapia, 2013] reportan el uso de este líquido iónico en la microextracción líquido-líquido de cafeína (log P = -0.7) y paracetamol (log P = 0.91), en la cual obtuvo recuperaciones entre 54 y 76 %; también reporta su

uso en la microextracción líquido líquido dispersiva de cafeína ($\log P = -0.7$), hidroclorotiazida ($\log P = -0.07$) y paracetamol ($\log P = 0.91$) dicho proceso arrojó valores de factores de enriquecimiento para estas moléculas entre 2 y 39. Otro trabajo en donde se ha empleado este líquido iónico como fase extractante es el de Padilla Alonso y colaboradores [Padilla-Alonso et al., 2017], en donde desarrollaron una técnica microextracción líquido líquido dispersiva asistida con temperatura para la extracción de glifosato ($\log P = -1.90$) y su principal metabolito ácido aminometilfosfónico en diferentes muestras de agua, obteniendo recuperaciones entre 75 y 99 %. Estos datos difieren con lo encontrado en este trabajo, ya que no fue posible extraer a los analitos más hidrofílicos estudiados tales como MET, CAF, BP-4 ($\log P = -2.60 - 0.37$), los cuales presentan valores de $\log P$ similares a los compuestos previamente estudiados por los autores mencionados.

Es importante mencionar que en los trabajos anteriores se hace uso de técnicas de preparación de muestra en fase líquida, las cuales emplean una mayor cantidad de fase extractante (líquido iónico) en comparación con la cantidad de fase extractante empleada en la SPME, la cual fue la técnica utilizada en este trabajo [Sarafraz-Yazdi et al., 2010]. Es bien conocido que la cantidad o volumen de fase extractante es uno de los parámetros que afectan la eficiencia de extracción [Cordero-Vaca et al., 2015]. Los trabajos previamente reportados demostraron que el líquido iónico presenta afinidad hacia compuestos hidrofílicos y la razón por la cual en este trabajo no se pudo extraer a los compuestos más hidrofílicos puede deberse a la poca cantidad de líquido iónico presente en la fase extractante desarrollada, lo cual genera que existan pocas interacciones de este componente con los analitos. Por otra parte, hay que recalcar que el recubrimiento también está compuesto por un adhesivo de naturaleza polimérica con cadenas hidrocarbonadas las cuales fácilmente pueden interaccionar con los analitos

más hidrofóbicos y es posible que estas interacciones predominen sobre las del líquido iónico, por lo que pudiera favorecerse la recuperación de este tipo de moléculas.

Por otra parte, en otros estudios previos donde se han desarrollado fibras a base de líquidos iónicos y estas han sido empleadas en la modalidad de inmersión directa, se ha reportado que tienen la capacidad de extraer analitos de naturaleza relativamente poco hidrofílica como los ésteres de ftalato ($\log P = 1.6 - 11.2$) [Zhou et al., 2012], piretroides ($\log P = 5.7 - 7.7$) [Zhang et al., 2012] y compuestos fenólicos ($\log P = 3.7 - 5.0$) [Cui, et al. 2015], estos resultados concuerdan con lo encontrado en este trabajo, ya que los analitos extraídos son los más hidrofóbicos.

6.6 Evaluación de la competencia de los analitos hacia la fibra

Los compuestos diana utilizados en esta investigación presentan diferentes características físicas y químicas. Por lo tanto, para evaluar la posible competencia de los ocho PPCPs hacia la fase extractante, se realizaron extracciones de estándares individuales de cada uno de los analitos a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. De estos experimentos se observó que aún y estando solos, los analitos más hidrofílicos (MET, CAF y BP-4) no eran extraídos (Figura 38). De modo que la presencia de los otros compuestos no interfiere en su afinidad hacia la fase extractante. Por lo tanto, la fase extractante no tiene la capacidad de extraerlos, o son extraídos en muy poca cantidad y debido al detector que posee el HPLC utilizado no podemos observar señal derivada de su presencia en los soluciones de desorción. Por consiguiente, podemos decir que el recubrimiento presentó una mayor afinidad hacia los compuestos más hidrofóbicos (MP, PP, NAP, DIC y BP-3) y poca o nula afinidad hacia los más hidrofílicos (MET, CAF y BP-4).

Sin embargo, cuando los analitos PP, NAP y BP-3 se extrajeron de manera individual presentaron una mayor eficiencia en la extracción, como puede verse en la gráfica de la Figura 37, esto puede ser atribuido a que hay menos moléculas en competencia por los sitios activos del recubrimiento [Heringa et al., 2003].

Como se mencionó anteriormente en el desempeño de la extracción de la fibra desarrollada no se encontró señal correspondiente a MET, CAF y BP-4, por lo que no era necesario tener un método cromatográfico relativamente largo para el análisis del total de los analitos modelo, por lo que se decidió realizar modificaciones al método cromatográfico en donde se incluían los ocho analitos tratando de encontrar un método que fuera capaz de separar a MP, PP, NAP, DIC y BP-3 en un tiempo más corto. Para cumplir con dicho objetivo se realizaron modificaciones al método original, se probaron distintos gradientes iniciando con un porcentaje de modificador orgánico de 20 a 60 % con diferentes etapas de duración y alcanzando hasta un 85 % de metanol, conforme el contenido inicial de modificador orgánico aumentaba, los tiempos de retención disminuían y en algunas ocasiones los picos cromatográficos se coleaban o ensanchaban. Se realizaron otros experimentos en donde se intentaba mejorar la forma y resolución de los picos cromatográficos y además, recortar el tiempo de retención. Debido a esto, las condiciones seleccionadas como óptimas fueron las que se muestran en la Tabla 27 y la Figura 39 es un ejemplo de un cromatograma obtenido bajo estas condiciones, mientras que la Tabla 28 muestra los tiempos de retención obtenidos para los cinco analitos estudiados.

Este método cromatográfico fue validado incluyendo los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, de acuerdo a lo especificado en el apartado 4.4.3 y los resultados se presentan en la Tabla 29. Como puede verse los límites de detección y cuantificación para todos los analitos fueron

menores a los encontrados en el método donde se incluían los ocho analitos modelo; esto puede ser debido a que los cromatogramas presentaron una menor deriva de la línea base en comparación con el otro método, ya que en el gradiente utilizado ocurren cambios en la composición más lentos, lo cual hace que se mantenga una línea base más estable permitiendo una adecuada integración de los picos cromatográficos aun en concentraciones bajas.

Como se ha mencionado, los parámetros que influyen en la eficiencia de extracción en SPME son: la naturaleza del recubrimiento de la fibra, el espesor de la película de recubrimiento (volumen o cantidad) y el área superficial del recubrimiento absorbente [Cordero-Vaca et al., 2015]. Considerando que el resto de las variables de la extracción y de la desorción permanecen constantes, se decidió evaluar el efecto del aumento de la cantidad de fase extractante, para esto se recubrieron 2.0 cm de del alambre desgastado con la mezcla de líquido iónico y adhesivo. Suponiendo, que no ocurría un aumento aparente del espesor, ya que el proceso de recubrimiento fue el mismo que se utilizó al recubrir los 1.4 cm de alambre. Al comparar la extracción obtenida con las fibras recubiertas de 1.4 y 2.0 cm, se observó que hubo un aumento considerable de la cantidad de analitos extraídos con la fibra de 2.0 cm, como puede verse claramente en la gráfica de la Figura 40. Los resultados obtenidos concuerdan con lo previamente reportado [Hosseini Banitaba et al., 2013].

6.7 Desempeño de la fibra en extracciones consecutivas

La vida media de las fibras de SPME es un factor crucial para su aplicación. En las fibras comunes la eficiencia de la extracción puede decrecer al incrementar el número de veces que la fibra es utilizada, debido al daño que ocurre en el recubrimiento cuando esta es expuesta a altas temperaturas, diferentes disolventes, ácidos o bases fuertes o diferentes matrices de muestra [Alpendadura, 2000].

Para evaluar la durabilidad y desempeño de la fibra en extracciones consecutivas, se realizaron extracciones seriadas de estándares de MP, PP, NAP, DIC y BP-4 en mezcla a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ con la misma fibra recubierta con el líquido iónico DMIM-BF₄ y el adhesivo UHU.

Al realizar las extracciones seriadas con la misma fibra, se observó que el área de los picos cromatográficos disminuye conforme aumenta el número de extracción, como puede verse en la gráfica de la Figura 41 y en los cromatogramas de las Figuras 42 y 43; esto puede deberse a la pérdida de líquido iónico del recubrimiento conforme se hacen las extracciones, ya que este componente fue el que le brindó una mayor eficiencia de extracción a la fibra. La razón de esto puede ser debido a que no hay una fuerte interacción entre los componentes del recubrimiento (líquido iónico y adhesivo). Debido al resultado anterior y a lo encontrado en cuanto a la estabilidad de la fibra frente a diversas soluciones, se decidió utilizar una fibra por extracción, es decir, la vida útil de la fibra desarrollada sería de solo un proceso de extracción - desorción.

Este resultado no concuerda con lo reportado por Gao y colaboradores [Gao et al., 2011], ya que desarrollaron una fibra de SPME que pudo ser usada más de 250 veces sin disminución de su eficiencia, sin embargo, hay que aclarar que ellos fabricaron el recubrimiento con otro líquido iónico, el hexafluorofosfato de 1-butil-3-

metilimidazolio (BMIM-PF₆) y con polianilina. El procedimiento de extracción lo realizaron por la modalidad de headspace, por lo tanto, el recubrimiento no tiene contacto directo con la matriz de la muestra, debido a esto existe menos probabilidad de daño por algún componente de la muestra y sobre todo mencionan que la gran vida útil de la fibra puede estar relacionada con las interacciones eficientes entre los iones imidazolio del BMIM-PF₆ y los electrones π de la polianilina.

En trabajos donde se han fabricado fibras de SPME y que han sido empleadas en la extracción por la modalidad de inmersión directa, se ha reportado que no se observó reducción de la eficiencia de la extracción después de que se realizaron 65 extracciones [Shi et al., 2016], en la fabricación de la fibra se utilizó el líquido iónico tris(pentafluoroetil) trifluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio y se menciona que la buena estabilidad de la fibra es debida a la hidrofobicidad extremadamente alta y baja hidrólisis del líquido iónico, el cual es distinto al empleado en este trabajo, esta puede ser la razón del resultado encontrado con la fibra desarrollada. Por otra parte, otros trabajos realizados por la modalidad de inmersión directa empleando fibras a base de líquidos iónicos, como el de Cui y colaboradores [Cui et al., 2015], no reportan haber realizado experimentos de la durabilidad o pérdida de eficiencia de la fibra, ellos fabricaron la fibra en base al líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio.

6.8 Establecimiento del método de extracción de los analitos modelo por SPME en modalidad de inmersión directa

La SPME es una técnica que se ve afectada por múltiples factores, por lo que su optimización suele ser un proceso largo y laborioso. En este trabajo, la optimización del método se llevó a cabo utilizando como estrategia el diseño experimental, con la finalidad de establecer las mejores condiciones de extracción y desorción de los PPCPs de interés, tratando de disminuir el número de experimentos que se deben de realizar y para determinar la significancia estadística y el efecto de cada una de los factores que intervienen en el proceso de la SPME. De esta manera, los factores considerados en la optimización del proceso completo de SPME, se evaluaron de forma separada, primero se optimizó la etapa de extracción y luego la etapa de desorción, con la finalidad de encontrar las condiciones de trabajo óptimas y lograr la mayor eficiencia en la extracción de los analitos modelo con la fibra desarrollada.

6.8.1 Optimización de la extracción

Como primer paso se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} , con el objetivo de rastrear los factores más importantes que afectan el sistema y poder encontrar la mayor eficiencia en la extracción. Los factores evaluados fueron el tiempo de extracción, temperatura, agitación, fuerza iónica (cantidad de sal) y tipo de sal.

En SPME, la extracción es más eficaz cuando los compuestos se encuentran sin disociar, es decir, en su forma neutra, por lo que es importante controlar el pH de las soluciones de extracción para mejorar la afinidad de cada compuesto a la fibra y

mejorar la eficiencia de extracción [Cui et al., 2015]. Sin embargo, debido a las diferencias de pKa de los analitos que se pretende extraer se decidió no controlar el pH de las muestras, ya que se prefirió no comprometer las respuestas de algunos de ellos en razón al pH ajustado y favorecer solo a algunos, además, en estudios previos de estabilidad de la fibra se observó que a pH 3 (ácido) y pH 9 (básico), se presentaba pérdida del recubrimiento.

Los efectos de los factores se evaluaron en relación a las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada uno de los analitos en los experimentos que comprendían el diseño experimental. Para evaluar el efecto y la significancia de los factores en la extracción de los analitos, se construyeron los gráficos de coeficiente escalados y centrados a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en las diferentes condiciones experimentales con ayuda del programa Modde 12.2. Dichos gráficos muestran un modelo de regresión lineal múltiple (MLR) para evaluar la relación entre una variable dependiente y una independientes. El tamaño del coeficiente representa el cambio en la respuesta cuando un factor varía su valor en las unidades codificadas. El efecto de la variable se considera significativo cuando el intervalo de confianza no cruza por el cero. Los parámetros del modelo R² (bondad de ajuste, R² > 0.5) y Q² (bondad de predicción, Q² > 0.5) revelan la validez del modelo. Se encontró que todos los analitos presentaban un buen comportamiento en el modelo diseñado de acuerdo con los valores obtenidos en los análisis de regresión realizados. Para la mayoría de los analitos, se encontraron valores de probabilidad mayores a 0.05 (falta de ajuste, p > 0.05), lo que indica un buen ajuste del comportamiento de los analitos en los sistemas estudiados y en la estimación del efecto estandarizado de cada factor, excepto para NAP y DIC, ya que se encontraron valores de 0.003 y 0.012, respectivamente.

Como se puede ver en los gráficos de coeficiente de la Figura 44, el factor temperatura presentó efecto significativo en la respuesta del MP, NAP y DIC, mientras que la agitación fue un factor que presentó efecto significativo para la respuesta de PP, DIC y BP-3. La fuerza iónica (cantidad de sal) solo tuvo efecto en la respuesta de NAP, por otra parte, cuando se evaluó el tipo de sal que se añadía en la solución de extracción, se encontró un efecto significativo para todos los analitos excepto para DIC.

El factor tiempo no tuvo un efecto significativo en la repuesta de ninguno de los analitos, por lo que se seleccionó el periodo más corto de extracción (15 min) para los ensayos futuros, con la finalidad de tener un método de análisis en el menor tiempo posible. Aunque la SPME es un método de extracción no exhaustivo, el tiempo está directamente relacionado con la cantidad de analito extraído, es posible obtener resultados cuantitativos y precisos cuando la extracción se realiza en condiciones donde no se ha alcanzado el equilibrio, siempre y cuando se controle de manera precisa el tiempo en el que se hace el procedimiento [Kang et al., 2105].

En cuanto a la agitación, se sabe que esta favorece la difusión y transferencia de masa de los analitos de la muestra hacia la fase extractante, contribuyendo a reducir el tiempo en el que se alcanza el equilibrio [Chen et al., 2010], por lo que se decidió trabajar a una velocidad de agitación de 800 rpm para los estudios siguientes, ya que se observó que la recuperación de los analitos cuando la extracción se llevaba a cabo con agitación era más alta que cuando el sistema no se agitaba.

La temperatura de extracción es crítica para la eficiencia de la extracción, debido a que afecta tanto a la cinética como a la termodinámica del proceso. Las altas temperaturas de extracción normalmente aumentan la velocidad de difusión de los analitos, lo que provoca extracciones más rápidas. Por otra parte, debido a que la adsorción es generalmente un proceso exotérmico, la cantidad de analitos adsorbidos en la fibra

disminuye cuando aumenta la temperatura [Zhao et al., 2011]. La temperatura resultó ser un factor significativo para las respuestas de 3 de los 5 analitos (MP, NAP, DIC). Sin embargo, al revisar cada uno de los datos obtenidos en los experimentos realizados, se detectó que al aumentar la temperatura las áreas de los picos cromatográficos de los analitos eran menores a los obtenidos cuando se trabaja el experimento a la temperatura de laboratorio; esto puede ser atribuido a que al aumentar la temperatura, se incrementa la solubilidad del líquido iónico en la solución acuosa de la muestra y que además, ocurre una disminución en su viscosidad [Paduszynski et al., 2014], lo que provoca que éste componente pudiera escurrir del recubrimiento inmovilizado en el soporte metálico por lo que la eficiencia de extracción de la fibra se ve disminuida. Por otra parte, se ha reportado que una de las desventajas de utilizar sales en la SPME por inmersión directa, es que pueden depositarse sobre la fibra, dependiendo del tipo de sal y del tipo de recubrimiento de la fibra [Liu et al., 2015]. Además, también se ha reportado que un aumento en la fuerza iónica de la solución de extracción, puede provocar un incremento en la viscosidad y densidad de la solución, lo cual se refleja en la disminución de la eficiencia del proceso de transferencia de masa hacia la fase extractante [Li et al., 2009]. Por otra parte, las sales divalentes tienen mayor capacidad de disminuir la solubilidad de las moléculas en solución acuosa por efecto del “salting out”, pudiendo impedir que la difusión de las moléculas de una fase a otra sea de manera homogénea [Zhao et al., 2011].

En los experimentos en donde se evaluó el efecto de la fuerza iónica, se observó que al utilizar la sal Na_2CO_3 , la película de la fase extractante depositada en el alambre cambiaba a un color blanco y mostraba un aspecto de cristales depositados sobre la fase (Figura 45), por lo que puede ser probable que los cristales observados sobre la fibra pudiesen ser de la sal o de los analitos precipitados, por lo que esta sal fue

descartada de los experimentos posteriores, continuando el trabajo solo con la sal NaCl.

Debido a los resultados anteriores y a lo observado en el diseño de experimentos, se decidió fijar los parámetros de tiempo (15 minutos), agitación (800 rpm) y el tipo de sal (NaCl) para los siguientes ensayos en el laboratorio, por lo que los factores a optimizar de manera individual serían solo la cantidad de sal añadida y la temperatura. Para llevar a cabo este objetivo, se construyó una prueba de modelado de dos factores (cantidad de NaCl añadido y temperatura), para encontrar el impacto de ellos en la respuesta a los niveles estudiados. De estos experimentos se generan los gráficos de contorno, en donde las funciones de respuesta son cónicas con picos en las esquinas del espacio factorial.

Como se puede ver en los gráficos de contorno de la Figura 46, para todos los analitos con bajas temperaturas y bajas concentraciones de sal, se maximiza la respuesta. Los valores predictivos de contenido de sal estuvieron en un rango de 0 a 4.5 % de NaCl y un rango de temperatura de 25 a 28 °C, la mayor respuesta se obtiene con el valor más bajo de ambos factores. Durante todos los experimentos se trabajó a temperatura de laboratorio (21 - 22 °C), codificado en el diseño como 25 °C, por lo tanto, se decidió trabajar a esta temperatura y optimizar la fuerza iónica (contenido de sal) mediante un diseño de factor por factor, tal y como observa en la Tabla 30.

En la gráfica de la Figura 47 se muestran los resultados obtenidos en la optimización del contenido de NaCl. El área de los picos cromatográficos obtenidos para el MP y PP aumentó cuando se incrementó el contenido de sal. El incremento en la cantidad de sal añadida disminuyó la extracción de DIC y BP-3, mientras que para NAP se obtuvo un comportamiento variable.

En soluciones acuosas, la adición de sal aumenta considerablemente la constante de distribución de las moléculas polares o aquellas que están presentes en su forma neutra por efecto del “salting out” y como resultado se aumenta la eficiencia de la extracción, como lo observado con MP y PP, lo cual concuerda con lo reportado por Canosa y colaboradores [Canosa et al., 2006].

Por otra parte, cuando las moléculas que se pretenden extraer son especies iónicas, se observa una disminución de la eficacia de la extracción ya que aumenta el coeficiente de actividad de las especies al aumentar la fuerza iónica de la disolución [Naccarato et al., 2014]. Es probable que este fenómeno esté ocurriendo con NAP y DIC, porque la eficiencia de su extracción fue favorecida conforme disminuía la cantidad de sal añadida en la solución, ya que probablemente las moléculas de estas sustancias están presentes en su forma iónica debido a su pKa (4.30 y 4.20, respectivamente) y al pH de la solución, el cual no fue controlado durante el desarrollo experimental. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zhang y colaboradores, ya que en su trabajo decidieron no adicionar NaCl a las muestras, porque observaron que obtenían mejores recuperaciones sin la adición de sal para ambas sustancias [Zhang et al., 2013]. Además, para el NAP, se observó un comportamiento distinto, la mayor respuesta se obtuvo sin adición de NaCl y se esperaría el comportamiento opuesto en el experimento en donde existía mayor cantidad de sal, sin embargo, se encontró una menor respuesta con el 3 % de NaCl, por lo que una respuesta de intensidad intermedia fue encontrada con el 5 % de NaCl. Este comportamiento puede ser atribuido a que, en las soluciones, como se mencionó anteriormente, no se controló el pH, y puede ser que las moléculas de NAP se encuentren ionizadas. Pudiendo explicarse debido a que se ha observado una fuerte dependencia de la eficiencia de extracción con respecto al valor de pH de la solución para los analitos básicos y ácidos; por lo tanto, el

rendimiento de la extracción de SPME se puede mejorar ajustando el pH de las muestras y se obtienen resultados mas reproducibles al convertir los analitos a sus formas neutras [Pereira et al., 2014].

Por otro lado, generalmente, cuando se adiciona sal a soluciones acuosas con presencia de solutos no polares, las solubilidades de estos disminuye y además la presencia de la sal incrementa la viscosidad y la densidad de la solución, disminuyendo la difusión de los analitos hacia la fibra de SPME y este proceso tiene un efecto más evidente cuando se trata de moléculas no polares, porque se disminuye aun más su solubilidad [Zhao et al., 2011]. Este fenómeno puede ser la razón de los resultados obtenidos para la BP-3, ya que es el analito más hidrofóbico (log P 4.0) en comparación con los otros analitos estudiados y se observó que la cantidad de analito extraído aumentaba conforme disminuía la cantidad de sal añadida a la muestra. Este mismo comportamiento lo reportan Canosa y colaboradores [Canosa et al., 2006] cuando vieron que al añadir NaCl a una mezcla de parabenos, la extracción de butilparabeno (log P 3.5) disminuía considerablemente, mientras que la extracción del etilparabeno (log P 2.4) y del propilparabeno (log P 2.9) aumentaban ya que estas son las moléculas más polares.

Finalmente, la cantidad de sal añadida a la solución se seleccionó de acuerdo al analito que presentó la respuesta más baja respecto a los otros analitos, pero al mismo tiempo la respuesta más alta dentro de ellas, por lo que la selección se llevó a cabo con respecto a las respuestas de DIC, como puede verse en las eficiencias de extracción de los experimentos mostrados en la gráfica de la Figura 47, por lo tanto se decidió no añadir NaCl a las soluciones de extracción.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción, se prosiguió a optimizar la etapa de desorción.

6.8.2 Optimización de la desorción

Como primera etapa se realizó un rastreo de los factores más importantes que afectan el sistema para poder encontrar la mayor eficiencia en la desorción, llevando a cabo el desarrollo de un diseño factorial completo 2^3 . Los factores evaluados fueron el tipo de disolvente, proporción de disolvente y el tiempo de desorción.

La desorción completa o de la mayor cantidad de los analitos de la fibra mejora la reproducibilidad y la sensibilidad del método. El volumen de disolvente es un factor vital para la eficiencia de la desorción, un gran volumen aumenta la eficiencia, pero disminuye la capacidad de concentrar la muestra [Cui et al., 2015]. También se debe de seleccionar el tipo de disolvente que asegure la mayor recuperación de analitos de la fase extractante, la combinación de disolventes con mayor fuerza de elución en general es beneficiosa para este objetivo [Feng et al., 2015].

En este trabajo, se decidió fijar el volumen de desorción a 300 μL , ya que es la cantidad de disolvente que cubre toda la fase extractante de la fibra fabricada que se puso en contacto con las soluciones de extracción.

Para evaluar el efecto y la significancia de los otros factores en la desorción, se construyeron los gráficos de coeficiente en relación con las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada uno de los analitos, al igual que en la optimización de la extracción con ayuda del programa Modde 12.2. Para la mayoría de los analitos, se encontraron valores de probabilidad mayores a 0.05 (lack of fit, $p > 0.05$), lo que indican un buen ajuste del comportamiento de los analitos en los sistemas estudiados y en la estimación del efecto estandarizado de cada factor, excepto para DIC, ya que se encontró un valor de 0.014.

Como se puede ver en los gráficos de coeficiente de la Figura 48, el tipo de disolvente fue significativo solo para el NAP, para los demás analitos no se encontró diferencia en la eficiencia de desorción al utilizar los tipos de disolventes estudiados. La proporción de disolvente tuvo un efecto significativo para todas las moléculas estudiadas, excepto para DIC. Por otra parte, el tiempo de desorción solo fue significativo para la respuesta de BP-3.

Al revisar los resultados obtenidos en todos los ensayos correspondientes al diseño de experimentos que se llevó a cabo, se observó un incremento en las respuestas cuando se trabajó con una mayor proporción de disolvente orgánico (30 %), debido a que la mayor presencia de metanol aumenta la fuerza de elución de la solución, permitiendo una mayor recuperación de los analitos [Wegmann et al., 2011], por lo que se decidió fijar este parámetro para los estudios posteriores.

Después se procedió a construir una prueba de modelado de dos factores (tipo de disolvente y tiempo de desorción), para encontrar el impacto de estos factores en la respuesta de los analitos, de estos experimentos se generaron los gráficos de contorno. Como se puede ver en los gráficos de la Figura 49, los valores predictivos del factor tiempo para maximizar la respuesta de los analitos diana estuvieron entre 10 y 30 minutos, mientras que los valores predictivos del factor tipo de disolvente también estuvieron entre los dos tipos de solución de desorción (agua/metanol y buffer/metanol), siendo una marcada tendencia hacia la solución agua/metanol más favorable para NAP y DIC, mientras que la solución buffer/metanol para PP. Por otra parte, se observó una ligera tendencia hacia la solución agua/metanol para MP, mientras que para BP-3 no se encontró diferencia en la respuesta utilizando cualquiera de las soluciones.

Por lo tanto, se decidió optimizar mediante un diseño de factor por factor el tiempo de desorción y el tipo de disolvente con las variables y valores que se presentan en la Tabla 31; en las gráficas de las Figuras 50 y 51 se muestran los resultados obtenidos en esta optimización. Como puede verse, el área de los picos cromatográficos de todos los compuestos, aumentó de manera significativa al incrementar el tiempo de desorción, debido a que procedimiento también es un fenómeno cinético, por lo que a mayor tiempo de contacto entre la fase extractante y la solución de desorción, mayor será la cantidad de analitos recuperados [Kaur et al., 2018], por lo que 30 min fue seleccionado como el tiempo óptimo de desorción.

En general, si se hace una comparación de los experimentos en base a las diferentes mezclas de desorción, se puede observar que al mismo tiempo de desorción las mayores respuestas se obtuvieron cuando se empleó la mezcla de metanol/agua, esto se puede atribuir a que la presencia del buffer (pH 4) en la otra solución de desorción, disminuye la afinidad de las moléculas hacia esta mezcla, pudiéndose explicar por los diferentes valores de pKa que poseen las distintas moléculas, que hace que exista repulsión electrostática entre las moléculas y las solución de desorción [Zhang et al., 2018]. Para el MP el emplear distinta mezcla de desorción no representó un cambio significativo en las respuestas obtenidas, en los distintos tiempos evaluados.

Si se centra la atención en los experimentos realizados al tiempo de 30 min con la mezcla agua/metanol (Experimentos 3A) y buffer/metanol (Experimentos 3B) como lo muestra la Figura 51, se pone en evidencia que al trabajar con la mezcla agua/metanol, se obtienen mayores respuestas para todos los analitos con respecto a la desorción con buffer/metanol, por otra parte, se observó que no hay diferencia significativa entre la desorción de MP, PP y BP-3 al trabajar con ambas mezclas, pero

el comportamiento contrario fue observado para NAP y DIC. Por lo tanto, la mezcla de agua/metanol fue seleccionada como disolvente de desorción.

En resumen, las condiciones encontradas como óptimas para el método de SPME por inmersión directa para el análisis de los PPCPs seleccionados son las que se muestran en la Tabla 32.

6.9 Evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la extracción de diferentes fibras bajo las condiciones óptimas

Después de la optimización, se comparó la eficiencia de la extracción de fibras dentro de un mismo y diferente lote a varias concentraciones. Se realizó un análisis de varianza partiendo de la suposición de que las medias poblacionales no difieren entre sí. El valor que se tomó como referencia para aceptar o rechazar la hipótesis nula es el nivel de significancia, si la probabilidad (valor p) es mayor a 0.05, aceptaremos la hipótesis nula de que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias.

Las fibras de los Lotes 1, 2 y 3 se evaluaron a concentraciones de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. En el análisis de varianza en todos los casos se obtuvieron valores de p (probabilidad) > 0.05 , lo cual indica que no hay diferencia estadísticamente significativa en la eficiencia de la extracción entre las fibras de cada uno de los lotes a las concentraciones evaluadas, como se puede ver en la Tabla 33. Las fibras de los Lotes 4, 5 y 6 se evaluaron en un solo grupo a las tres concentraciones antes mencionadas y en el análisis de varianza se obtuvo un valor de p (probabilidad)

igual a 0.983, lo cual indica que no hay diferencia estadísticamente significativa en la eficiencia de la extracción entre las fibras pertenecientes a diferentes lotes de fabricación a las concentraciones evaluadas, como se puede ver en la Tabla 34.

Para investigar la reproducibilidad de la eficiencia de la extracción de fibra a fibra y de lote a lote, se evaluaron tres fibras preparadas en el mismo lote y tres fibras preparadas con el mismo procedimiento pero de diferentes lotes, los experimentos se llevaron a cabo a concentraciones de 0.5, 1.5 y 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se calculó el % DER de las respuestas obtenidas. La Tabla 33 muestra los resultados obtenidos para la reproducibilidad obtenida en la eficiencia evaluada de fibra a fibra, entre el mismo lote. Como puede verse para el Lote 1 se obtuvieron valores de % DER entre 2.052 a 9.312 %, para las fibras del Lote 2 los % DER estuvieron en un rango de 2.905 a 8.905 %, mientras que las fibras del Lote 3 presentaron valores de % DER en un intervalo de 1.983 a 9.009 %.

Por otra parte, en la Tabla 34 se resumen los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo para la reproducibilidad de las fibras lote a lote. La eficiencia de las fibras evaluadas a una concentración de 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presentó un % DER de 3.725 a 9.195 %. Cuando los experimentos se realizaron 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ los valores de % DER estuvieron en un rango de 3.877 a 12.486 % y cuando se trabajó a una concentración de 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ los resultados arrojaron % DER en un rango de 2.405 a 8.947 %.

En general, los mayores porcentajes se obtuvieron en las respuestas obtenidas cuando se compara la eficiencia entre las fibras de diferente lote, sin embargo, todos los valores fueron menores al 15 %, lo cual indica una buena reproducibilidad no solo entre fibras del mismo lote, sino también entre fibras de diferente lote. Estos resultados concuerdan con los reportados por Shi y colaboradores [Shi et al., 2016], ya que ellos

mencionan que la reproducibilidad dentro de una misma fibra estuvo en un rango de 1.2% - 15% y de fibra a fibra entre 5.5 - 16 %. Por otra parte, Cui y colaboradores [Cui et al., 2015] reportan que ellos encontraron valores de repetibilidad fibra a fibra menores al 11.2 %

La variabilidad de las respuestas obtenidas puede ser atribuida a la gran cantidad de parámetros que hay que controlar en el desarrollo del proceso de SPME, pero en este caso puede pensarse que la mayor contribución a la variabilidad de los resultados obtenidos es debido al procesos de recubrimiento de la fibra desarrollada, porque son muchas las variables que influyen en el proceso de fabricación de dicha fibra y la mayoría de ellos dependen del control exclusivo del analista.

El recubrimiento de la fibra desempeña un papel fundamental en la SPME. En general, el rendimiento de una fibra depende tanto de la estructura como en las propiedades y características de las moléculas utilizadas como componentes de la fase extractante, así como también en la metodología empleada para la preparación e inmovilización del recubrimiento. Por lo tanto, el emplear una metodología de fabricación reproducible garantiza resultados reproducibles [Aziz et al., 2014; Lashgari et al., 2019].

6.10 Validación del método de SPME por inmersión directa

El desempeño analítico del método desarrollado para el análisis de los PPCPs (MP, PP, NAP, DIC y BP-3) se evaluó bajo las condiciones óptimas encontradas en los estudios previos, para determinar su potencial aplicabilidad en el análisis de muestras reales.

Inicialmente se pretendía validar el método en un intervalo de concentración de 0.5 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en soluciones estándar preparadas en 100 % de agua desionizada. Al realizar los estándares se observó que a partir de la concentración de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ las soluciones se enturbiaban, lo que hizo pensar que ocurría la precipitación de algunos de los analitos o al menos de aquellos que poseen la menor solubilidad en agua, debido a esto se decidió acortar el intervalo de trabajo hasta 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Las curvas de calibración se trazaron utilizando estándares de los PPCPs de 0.5, 2.5, 5.0, 10, y 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en agua desionizada. Para cada nivel, se realizaron tres extracciones y desorciones repetidas en las condiciones óptimas del método.

Como se puede ver en los resultados de la Tabla 35, el método propuesto muestra una buena linealidad para todos los analitos con coeficientes de determinación (r^2) dentro de un intervalo de 0.996 – 0.998. Además, los datos en los gráficos de residuales mostraron una distribución normal y se encontraron valores de DER de los factores de respuesta $< 15\%$ en todos los niveles de concentración evaluados. Por lo tanto, este rango lineal hace pensar que la metodología es adecuada para el análisis de muestras dentro de esas concentraciones.

La precisión del método fue evaluada por medio del porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de las respuestas en cada nivel de concentración de la curva de calibración, los valores encontrados para el MP estuvieron en un rango de 1.56 – 3.17 %, para el PP fueron de 2.67 - 4.05 %, el rango fue de 1.44 – 3.06 % para el NAP, mientras que para DIC y BP-4 estuvieron entre 1.79 -2.15 % y 0.99 – 2.58 %, respectivamente, lo cual es indicativo de una buena precisión del método, por lo tanto, el método es capaz de generar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas bajo las mismas condiciones.

La exactitud fue investigada por medio del gráfico de la concentración de cada uno de los estándares en función de la concentración calculada para cada uno de ellos con la ecuación de la recta obtenida en los estudios de linealidad. Como se puede ver en la Tabla 35, para todos los analitos las gráficas generadas presentaron valores de $r^2 > 0.995$ con pendientes iguales a 1, lo cual es indicativo de una buena exactitud del método, por lo tanto, dicho método tiene la capacidad de arrojar valores con una gran cercanía a los valores reales de los analitos investigados.

El límite de detección para el MP fue de $0.046 \mu\text{g mL}^{-1}$, para el PP de $0.039 \mu\text{g mL}^{-1}$, para el NAP de $0.093 \mu\text{g mL}^{-1}$, para el DIC de $0.079 \mu\text{g mL}^{-1}$ y para la BP-3 de $0.023 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, el límite de detección fue de $0.139 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el MP, $0.118 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el PP y de $0.279 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el NAP, mientras que para el DIC y la BP-3 fueron de $0.237 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.070 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

A partir de los resultados analíticos del método, se puede ver que los menores límites de detección y cuantificación se obtuvieron para el MP, PP y la BP-3, esto hace pensar que existe una mayor cantidad de interacciones o una mayor afinidad de estos analitos

hacia la fase extractante desarrollada en comparación con DIC y NAP, bajo las condiciones evaluadas. Además, la sensibilidad y, por lo tanto, los límites de detección pueden mejorarse utilizando otros detectores como los espectrómetros de masas [Feng et al., 2012; Sarafray-Yazdi et al., 2012].

Estos datos demuestran que el método basado en la fibra desarrollada tiene un gran potencial en la extracción y determinación de los PPCPs incluidos en este trabajo.

6.11 Aplicabilidad del método: análisis de las muestras

Para evaluar la eficiencia de la aplicación del método de DI-SPME seguido de HPLC-DAD desarrollado para el análisis de PPCPs con la fibra fabricada a base de líquido iónico DMIM-BF₄ y el pegamento UHU, se analizaron muestras reales de agua potable de la red abastecimiento de varios municipios de la Zona Metropolitana de Monterrey.

Se realizaron experimentos de recuperación y precisión en las muestras enriquecidas con los PPCPs a un nivel de 1.5 µg mL⁻¹ para investigar el posible efecto de la matriz de la muestra en la capacidad de extracción del recubrimiento. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se presentan en las Tablas 36 y 37.

Con los ensayos de recuperación se evaluó el posible efecto de matriz que la muestra podría ejercer en la metodología desarrollada. Los resultados de porcentaje de recuperación encontrados para M1 fueron, un mínimo de 9.782 % para DIC y un máximo 118.896 % para MP; para M2 el mínimo fue de 27.420 % para DIC y el máximo de 179.161 % para MP; mientras que para M3 se encontró el mínimo para

DIC de 19.863 % y el máximo para PP de 112.158 %; M4 presentó un mínimo de 3.390 % para DIC y 116.638 % como máximo para PP; en M5 se encontró 21.518 % como valor mínimo, correspondiente a DIC y 107.236 % como máximo, correspondiente a MP; para M6 el valor más bajo fue de 33.403 % y fue para DIC, mientras que el valor más alto fue de 148.158 % y fue para MP; en M7 el valor más bajo fue de 10.373 % y el más alto de 106.85 %, pertenecientes a DIC y PP, respectivamente. Por otra parte, para M8 la recuperación más baja se encontró para DIC con 16.901 % y la más alta para MP con 103.031 %; en M9 el analito con la menor recuperación resultó ser DIC con un 3.411 % y el de mayor recuperación fue MP con un 127.843 %; por último para M10 la menor recuperación fue encontrada para DIC con un porcentaje de 27.426 % y la mayor recuperación fue para MP con un porcentaje de 183.297 %.

La Figura 53b muestra un cromatograma típico obtenido después de la extracción de una muestra (M1) enriquecida a $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde se puede ver los picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los analitos añadidos y también se muestran los espectros de UV correspondientes a cada uno de ellos.

En todas las muestras los valores de recuperación más altos se encontraron para MP o PP, seguidos de BP-3, luego NAP y los valores más bajos fueron para DIC. Al revisar las concentraciones obtenidas se pudo ver que la fase extractante no tiene la capacidad de concentrar a los analitos. En general, MP y PP eran extraídos aproximadamente al mismo nivel que eran añadidos a las muestras, obteniendo recuperaciones entre 103 y 183 % para MP y 97 y 158 % para PP. Para la BP-3 se encontraron recuperaciones entre 67 y 110 %, estos resultados pueden ser indicativos de un posible efecto de la

matriz de la muestra, el cual fue muy marcado para NAP y DIC, ya que se encontraron recuperaciones en un rango de 45 a 57 % y de 3 a 35 %, respectivamente. El efecto de la matriz se evidenció al comparar las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis de las muestras con los que se obtuvieron en la validación del método, ya que en la validación se trabajó con estándares preparados en agua desionizada y después eran sometidos al proceso de extracción.

El haber encontrado efecto de matriz en las muestras analizadas, implica que se requiera la construcción de curvas de calibración en matriz de muestra y/o calibraciones por adición estándar para confirmar la ausencia o presencia del efecto de la matriz y poder realizar una cuantificación precisa y exacta de los analitos [Dashtbozorgi et al., 2013; Trujillo-Rodríguez et al., 2019].

Los principales factores que influyen en la eficiencia de extracción en la SPME son la naturaleza, espesor y área superficial del recubrimiento, considerando que el resto de las variables de la extracción y de la desorción permanecen constantes [Cordero-Vaca et al., 2015]. En este estudio, las fibras basadas en el líquido iónico DMIM-BF₄ y el adhesivo UHU presentan la misma longitud de recubrimiento (2 cm) y en teoría el mismo espesor de la película de la fase extractante (7.12 μm), por lo que se puede asumir que las áreas superficiales son similares para todas las fibras y como una aproximación se puede pensar que la falta de capacidad de concentración de la fibra fabricada está limitada por la cantidad o volumen de fase extractante y por la naturaleza físico-química de dicho recubrimiento [Nawała, et al.; 2018].

Por otra parte, se llevó a cabo el análisis fisicoquímico de las muestras M1, M2 y M3, por el Laboratorio de Servicio Analítico del Departamento de Química Analítica y los resultados son los que se muestran en la Tabla 38.

Tabla 38. Resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico de las muestras 1, 2 y 3.

Parámetro	Muestra 1 (M1)	Muestra 2 (M2)	Muestra 3 (M3)
pH	6.06	7.06	7.30
Conductividad	84 mS m ⁻¹	84.5 mS m ⁻¹	76 mS m ⁻¹
Solidos totales	631 mg L ⁻¹	677 mg L ⁻¹	561 mg L ⁻¹
Dureza (CaCO ₃)	398.9 mg L ⁻¹	395.4 mg L ⁻¹	356.9 mg L ⁻¹
Alcalinidad (Na ₂ CO ₃)	283.5 mg L ⁻¹	282.4 mg L ⁻¹	255.3 mg L ⁻¹
Cloruros	0.177 mg L ⁻¹	0.101 mg L ⁻¹	0.426 mg L ⁻¹
Nitratos	10.5 mg L ⁻¹	10.7 mg L ⁻¹	8.4 mg L ⁻¹
Sulfatos	105 mg L ⁻¹	96 mg L ⁻¹	93 mg L ⁻¹

El pH y la gran cantidad de sales de las muestras, hacen que estas matrices sean muy distintas a las soluciones estándar (agua desionizada) con las cuales se llevó a cabo la validación del método, lo cual corrobora el efecto negativo que la matriz de la muestra tuvo sobre las recuperaciones obtenidas de los analitos, sobre todo con lo que respecta al NAP y DIC. La presencia de la sal y el pH de las muestras, además de las propiedades físicas y químicas de los analitos no permitieron que la extracción se llevara a cabo de forma adecuada, debido a la disminución de la afinidad de los analitos, sobre todo de NAP y DIC, hacia la fase extractante.

Los dos mecanismos dominantes en la SPME son la adsorción y la partición y, dependen del tipo de recubrimiento de la fibra. En una extracción eficiente, existe una fuerte correlación entre la composición química de la fase extractante y las propiedades de los analitos. Una manera de investigar la afinidad de los analitos hacia la fase extractante y, por lo tanto, evidenciar la capacidad y responsabilidad de extracción de dicha fibra es por medio del cálculo de los coeficientes de partición analito–fase extractante [Zhang et al., 2014; Trujillo-Rodríguez et al., 2014], lo cual permitiría evidenciar la afinidad que tiene cada moléculas hacia el recubrimiento.

En la literatura, otros trabajos han reportado la utilización de las pendientes de calibración normalizadas como una herramienta para comparar las eficiencias de extracción de recubrimientos con diferentes espesores. Este parámetro se calcula a partir de la relación entre la pendiente de calibración obtenida del método SPME desarrollado y el espesor de la película de la fibra. Por lo tanto, cuando se utilizan pendientes normalizadas, la comparación de la eficiencia de extracción solo se enfoca en responsabilizar a la naturaleza de las fibras como una medida de la afinidad de los

analitos hacia la fibra [Pacheco-Fernández et al., 2016; Gionnfrido et al., 2018]. Estos experimentos podrían ayudar a asignar responsabilidades en cuanto a los resultados obtenidos con la fibra fabricada.

En cuanto a los porcentajes de desviación estándar relativa para todos los analitos fueron menores al 15 %, con excepción de DIC. Los % DER para MP estuvieron entre 4 – 10 %, para PP entre 3 – 11%, para NAP entre 1 – 5 %, para BP- 3 se obtuvieron valores en un rango de 1 – 13 %, mientras que los porcentajes para DIC fueron los más altos en todas las muestras, presentando valores entre 6 – 16 %. Los % DER son muy variados entre cada uno de los analitos estudiados, debido a la naturaleza física y química tan distinta que poseen cada uno de ellos, y a los evidentes efectos de la matriz de la muestra que fueron encontrados, sin embargo, aunque las recuperaciones para algunos de los analitos no son satisfactorias, estos resultados demuestran una adecuada precisión del método propuesto para el análisis de PPCPs en muestras de agua.

De igual manera, se realizaron extracciones en muestras sin adición de PPCPs y en ninguno de los casos se detectó la presencia de los analitos incluidos en este trabajo o si había, estos estaban por debajo de los límites de detección del método, el inciso a) de la Figura 53a muestra un cromatograma representativo obtenido después de la extracción de una muestra (M1) sin adición de PPCPs utilizando la fibra desarrollada.

6.12 Comparación del método propuesto con otros similares

Hoy en día existen una gran cantidad de trabajos enfocados al análisis o monitoreo de PPCPs en una amplia diversidad de muestras, utilizando una gran variedad de técnicas de preparación de muestra y la determinación se realiza por cromatografía de gases o líquidos [García-Córcoles et al., 2018; Martin-Pozo et al., 2019].

El método propuesto se comparó con otros métodos encontrados en la literatura reciente, desarrollados para la determinación de PPCPs en muestras de agua en términos de tiempo de extracción, rango lineal, porcentaje de recuperación y límite de detección. Con la finalidad de hacer los datos más comparables, se eligieron metodologías en donde el análisis se realizó por medio de SPME por inmersión directa acoplado a HPLC-UV o HPLC-DAD.

Los métodos que se resumen en la Tabla 39, muestran que todos tienen límites de detección y rangos lineales mucho más bajos que los del método propuesto en este trabajo; lo cual, principalmente puede deberse a los múltiples parámetros de las técnica de extracción optimizados por cada uno de los autores en los diversos trabajos, a las diferencias en la metodología de fabricación y a los componentes de los recubrimientos de las fibras desarrolladas.

An y colaboradores [An et al., 2018], desarrollaron una fibra a base de líquidos iónicos poliméricos de confinado doble, la cual mostró una buena eficiencia y sensibilidad para BP-3, esto puede deberse a la gran afinidad hacia el analito y la gran capacidad de carga del recubrimiento; la fibra desarrollada en este trabajo consiste en una sola capa de recubrimiento, lo cual le confiere una menor capacidad de carga. Además, en el trabajo de An y colaboradores, se incrementó el contenido de sal en la muestra, mientras que en el nuestro no se incrementó la fuerza iónica en la extracción, porque

como se mencionó anteriormente, altos contenidos de sal pueden disminuir la eficiencia de extracción de analitos no polares.

Los bajos límites de detección y cuantificación reportados por Ma y colaboradores [Ma et al., 2017] para la extracción de filtros UV, pueden deberse a que la fase extractante está compuesta por nanotubos de titanio recubiertos con polianilina lo cual genera recubrimientos altamente porosos con una gran área superficial facilitando la retención de los analitos, la cual también es favorecida por los ácidos de Lewis presentes en la composición del recubrimiento, sin embargo, el recubrimiento desarrollado y utilizado en este trabajo está compuesto por materiales polimérico de naturaleza líquida, generando una menor área superficial, lo cual puede repercutir en bajas eficiencias de extracción.

Por otra parte, Liu y colaboradores [Liu et al., 2017], prepararon una fibra por copolimerización por radicales libres de hexafluorofosfato de 1-vinilbencil-3-metilimidazolio, divinilbenceno y magnetita recubierta de sílice. Ellos observaron que el pH afectaba la extracción, la razón es que, a bajos valores de pH, los átomos de nitrógeno en el adsorbente (grupos imidazol) están protonados, por lo tanto, había una repulsión iónica que minimizó las interacciones π - π e hidrófobas entre el adsorbente y los analitos. Con el aumento de pH, ocurre la desprotonización y disminución de la repulsión iónica, por eso ajustaron el pH de las muestras a 8. En este trabajo no hubo ajuste de pH, esa puede ser la razón de la baja sensibilidad obtenida, por lo menos para los parabenos.

Un dispositivo de SPME compuesto por una fase extractante de agarosa, quitosan y nanotubos de carbono de pared múltiple fue desarrollado por Wan Ibrahim y colaboradores [Wan Ibrahim et al., 2018] para la extracción de fármacos anti-inflamatorios. El quitosano está dotado con un alto contenido de grupos amino con

gran capacidad de adsorción, pero sensible al pH. Mientras tanto, la agarosa ofrece flexibilidad molecular con una alta resistencia al pH. Los nanotubos de carbono de paredes múltiples son polímeros de carbono con múltiples capas en forma tubular altamente porosa lo cual le permite presentar una alta eficiencia de extracción aunque presente un espesor similar (6.58 - 6.90 μm) al recubrimiento desarrollado en el presente trabajo.

Es importante mencionar que los trabajos anteriormente descritos se centraron en el análisis de moléculas pertenecientes a una misma clase de PPCPs, tales como filtros UV, parabenos o antiinflamatorios no esteroideos. Mientras que los analitos estudiados en este trabajo, son compuestos que forman parte de todas esas clases de PPCPs y que son analizados en una misma corrida analítica.

Tabla 39. Comparación del método propuesto con otros métodos para la extracción y análisis de PPCPs.

Analito	Muestra	Tiempo	Rango lineal	% R	LOD	Ref.
MP PP	Agua de grifo, río y lago	7 min	0.5 – 200 µg L ⁻¹ 1 – 200 µg L ⁻¹	89 – 105 91 – 102	0.046 µg L ⁻¹ 0.11 µg L ⁻¹	[Liu et al., 2017]
BP-3	Agua de río y residual	68 min	0.2 – 200 µg L ⁻¹	92.6	0.05 µg L ⁻¹	[Ma et al., 2017]
BP-3	Agua de grifo, alberca y lago	90 min	0.5 – 200 µg L ⁻¹	98 – 118	0.2 µg L ⁻¹	[An et al., 2018]
NAP DIC	Agua de pozo y río	35 min	1 – 200 µg L ⁻¹ 10 – 500 µg L ⁻¹	> 94	0.89 µg L ⁻¹ 4.89 µg L ⁻¹	[Wan Ibrahim et al., 2018]
MP PP NAP DIC BP-3	Agua de grifo	45 min	500 – 15000 µg L ⁻¹	3 – 183	23 – 279 µg L ⁻¹	-

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método por HPLC, para la determinación simultánea de los ocho PPCPs incluidos en el estudio.

Se fabricó una fibra de SPME de soporte metálico con recubrimiento de una mezcla de DMIM-BF₄ + UHU. La fibra presentó una buena estabilidad mecánica, buena adherencia y uniformidad del recubrimiento, con un espesor promedio de 7.12 μm , además, presentó poca resistencia a la inmersión en soluciones de pH ácido y alcalino y ante diferentes disolventes orgánicos polares.

El recubrimiento de la nueva fibra presentó mayor afinidad hacia los compuestos más hidrofóbicos de los analitos modelo estudiados.

No se observó diferencia significativa en la eficiencia de extracción de las fibras pertenecientes a un mismo o diferente lote.

Se desarrolló y validó un método de SPME por inmersión directa para la extracción de MP, PP, NAP, DIC y BP-3, el cual resultó ser lineal, preciso y exacto.

El método establecido se aplicó al análisis de muestras de agua potable, el cual resultó ser una buena alternativa para el análisis de MP, PP, NAP y BP-3.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Evaluar otros procesos de recubrimiento para aumentar el espesor de la fase extractante.

Evaluar otros adhesivos para brindar una mayor durabilidad al recubrimiento.

Determinar los coeficientes de partición de los analitos en la fase extractante.

Evaluar algún tratamiento previo en las muestras antes de la extracción para disminuir el efecto matriz y aumentar la recuperación de los analitos, principalmente NAP y DIC.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

Aguilera, H. E.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. The roles of ionic liquids in sorptive microextraction techniques. *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 602 – 616.

Alpendadura, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for simple preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A.*, 2000, 889, 3 – 14.

Al-Qaim, F. F.; Abdullah, M. P.; Othman, M. R.; Latip, J.; Zakaria, Z. Multi-residue analytical methodology-based liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in surface water and effluents from sewage treatment plants and hospitals. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1345, 139 – 153.

Amini, R.; Rouhollahi, A.; Adibi, M.; Mehdinia, A. A new disposable ionic liquid based coating for headspace solid-phase microextraction of methyl tert-butyl ether in a gasoline sample followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Talanta*, **2011**, 84, 1 – 6.

An, J.; Anderson, J. L. Determination of UV filters in high ionic strength sample solutions using matrix-compatible coatings for solid-phase microextraction. *Talanta*, **2018**, 182, 74 – 82.

Anderson, J. L.; Ding, J.; Welton, T.; Armstrong, D. W. Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14247-14254

Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145 – 2148.

Azenha, M.; Nogueira, P. J.; Silva, A. F. Unbreakable solid-phase microextraction fibers obtained by Sol-gel deposition on titanium wire. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2071 – 2074.

Aziz, Z. M. O.; Mehdinia, A. A review on procedures for the preparation of coatings for solid phase microextraction. *Microchim. Acta.* **2014**, 181, 1169 – 1190.

Aznar, R.; Albero, B.; Sánchez, B. C.; Miguel, E.; Martín, G. I.; Tadeo, J. L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, doi: 10.1007/s11356-016-6327-8.

Baba, K.; Arao, T.; Yamaguchi, N.; Watanabe, E.; Eun, H.; Ishizaka, M. Chromatographic separation of arsenic species with pentafluorophenyl column and application to rice. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1354, 109 – 116.

Bianchi, F.; Bisceglie, F.; Dugheri, S.; Arcangeli, G.; Cupelli, V.; Del Borrello, E.; Sidisky, L.; Careri, M. Ionic liquid-based solid phase microextraction necklaces for the environmental monitoring of ketamine. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1331, 1 – 9.

Birch, G. F.; Drage, D.S.; Thompson, K.; Eaglesham, G.; Mueller, J. F. Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* **2015**, 97, 56 – 66.

Boyacı, E.; Rodríguez, L., Á.; Gorynski, K.; Mirnaghi, F.; Souza-Silva, É. A.; Hein, D.; Pawliszyn, J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, 873, 14 – 30.

Bratkowska, D.; Marcé, R. M.; Cormack, P. A. G.; Borrull, F.; Fontanals, N. Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 706, 135 – 142.

Bu, Q.; Wang, B.; Huang, J.; Deng, S.; Yu, G. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *J. Hazard. Mater.* **2013**, 262, 189 – 211.

Buchberger, W. W. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 603 – 618.

Buffeteau T.; Grondin, J.; Lassegues, J. C. Infrared Spectroscopy of Ionic Liquids: Quantitative Aspects and Determination of Optical Constants. *Appl. Spectrosc.* **2010**, 64, 112 – 119.

Burke, S. Regression and Calibration. LC GC Europe Online Supplement. 2001, 13 – 18.

Canongia Lopes, J. N.; Costa Gomes, M. F.; Pádua, A. A. H. Nonpolar, Polar, and Associating Solutes in Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 16816 – 16818.

Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Bollaín, M. H.; Cela, R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1124, 3 – 10.

Celano, R.; Piccinelli, A. L.; Campone, L.; Rastrelli, L. Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction prior to ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1355, 26 – 35.

Cerqueira, B. R. M.; Guilherme, R. J.; Caldas, S. S.; Martins, L. M.; Zanella, R.; Primel, G. E. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of

pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere*. **2014**, 107, 74 – 82.

Chen, J.; Zou, J.; Zeng, J.; Song, X.; Ji, J.; Wang, Y.; Ha, J.; Chen, X. Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. *Anal. Chim. Acta*. **2010**, 678, 44 – 49.

Chhetri, H. P.; Thapa, P.; Van Schepdael, A. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharm. J.* **2014**, 22, 483 – 487.

Chong, S.; Wang, D.; Hayes, J.; Wilhite, B.; Malik, A. Sol-gel coating technology for the preparation of solid-phase microextraction fibers of enhanced thermal stability. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3889 – 3898.

Cordero-Vaca, M; Trujillo-Rodríguez, M. J.; Zhang, C.; Pino, V.; Anderson, J. L.; Afonso, A. M. Automated direct-immersion solid-phase microextraction using crosslinked polymeric ionic liquid sorbent coatings for the determination of water pollutants by gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4615 – 4627.

Criterios para la verificación de métodos fisicoquímicos farmacopeicos. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Cofepris. Secretaría de Salud. México. 2017

Cui, M.; Qiu, J.; Li, Z.; He, M.; Jin, M.; Kim, J.; Quinto, M.; Li, D. An etched stainless steel wire/ionic liquid-solid phase microextraction technique for the determination of alkylphenols in river water. *Talanta*. **2015**, 132, 564 – 571.

Dashtbozorgi, Z.; Ramezani, M. K.; Husain, S. W.; Abrumand-Azar, P.; Morowati, M. Validation of matrix matched calibration for analysis of insecticide and fungicide residues in cucumber and tomato using QuEChERS simple preparation followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chil. Chem. Soc.* **2013**, 58, 1701 – 1705.

D'Amelia, R. P.; Samantha Gentile, S.; Nirode, w. F.; Huang, L. Quantitative Analysis of Copolymers and Blends of Polyvinyl Acetate (PVAc) Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Elemental Analysis (EA). *World Journal of Chemical Education*. **2016**, 4, 25 – 31.

Dévier, M. H.; Mazellier, P.; Aït-Aïssa, S.; Budzinski, H. New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *C. R. Chimie*. **2011**, 14, 766 – 779.

Dhanapal, P.; Nazirudeen, M; Ibrahim, S. Corrosion Behavior of Stainless Steel in Hydrochloric Acid and Nitric Acid Solutions. *International Conference on Systems, Science, Control, Communication, Engineering and Technology*. **2015**, 110 – 114.

Díaz-Álvarez, M; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. Hollow fibre liquid-phase microextraction of parabens from environmental waters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **2013**, 93, 727 – 738.

Down, J. L.; MacDonald, M. A.; Tetreault, J.; Williams, R. S. Adhesive testing at the canadian conservation Institute-an evaluation of selected poly (vinylacetate) and acrylic adhesives. *Stud. Conserv.* **1996**; 41, 19 – 44.

Ebele, A. J; Abdallah, M, A. E.; Harrad, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, **2017**, 3, 1 – 16.

El-Wasseef, D. L. Simultaneous Determination of Metformin, Nateglinide and Gliclazide in Pharmaceutical Preparations Using Micellar Liquid Chromatography. *Int. J. Biomed. Sci.* **2012**; 8, 144 – 151.

Ellis, J. B.; Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ. Pollut.* **2006**, 144, 184 – 189.

EPA Method 1694. Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. **2007**.

EPA Method 198. Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS. **2007**.

Farajzadeh, M. A.; Rahmani, N. A. Electrolytically produced copper (I) chloride on the copper wire as an excellent sorbent for some amines. *Talanta*. **2005**, 65, 700 – 704.

Euerby, M. R.; Petersson, P.; Campbell, W.; Roe, W. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis. *J. Chromatogr. A*. **2007**, 1154, 138 – 151.

Fekete, S.; Ganzler, K.; Fekete, J. Efficiency of the new sub-2 μm core-shell (KinetexTM) column in practice, applied for small and large molecule separation. **2010**, 54, 482 – 490.

Feng, J.; Sun, M.; Xu, L.; Li, J.; Liu, X.; Jiang, S. Preparation of metal wire supported solid-phase microextraction fiber coated with multi-walled carbon nanotubes. *J. Sep. Sci.* **2011**, 34, 2482 – 2486.

Feng, J.; Sun, M.; Wang, X.; Liu, X.; Jianga, S. Ionic liquids-based crosslinked copolymer sorbents for headspace solid-phase microextraction of polar alcohols. *J. Chromatogr. A*. **2012**, 1245, 32 – 38.

Feng, J.; Sun, M.; Bu, Y.; Luo, C. Development of a functionalized polymeric ionic liquid monolith for solid-phase microextraction of polar endocrine disrupting chemicals in aqueous samples coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 7025 – 7035.

Filho, A.; Silva, R.V.; Bertolo, R.V.; A new stainless steel wire for orthodontic purposes. *Dental Press J. Orthod.* **2011**, 16, 55 – 59.

Foley, J. P.; Dorsey, J. D. Equations for Calculation of Chromatographic Figures of Merit for Ideal and Skewed Peaks. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 730 – 737.

Gao, Z.; Li, W.; Liu, B.; Liang, F.; He, H.; Yang, S.; Sun, C. Nano-structured polyaniline-ionic liquid composite film coated steel wire for headspace solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in water. *J. Chromatogr. A.*, **2011**, 1218, 6285 – 6291.

García-Córcoles, M.T.; Rodríguez-Gómez, R.; Alarcón-Gómez, B.; Çipa, M.; Martín-Pozo, L.; Kauffmann, J. M.; Zafra-Gómez, A. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2018**, DOI:10.1080/10408347.2018.1496010

Gary, D. Christian; *Química Analítica*; 6ª Edición, Ed. Mc Graw Hill, México, **2009**.

Garza, M.; Chávez A. Moyano E.; Galceran M. T.; Waksman N.; Castro R. Liquid Chromatography for the Analysis of Hydrophilic Drugs in the Presence of Ionic Liquids. *J. Mex. Chem. Soc.* **2014**, 58, 16 – 21.

Garza-Tapia, M. Evaluación del desempeño de líquidos iónicos como solventes para fármacos hidrofílicos y su aplicación en procesos de microextracción en fase líquida. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico, **2013**.

Gionfriddo, E.; Souza-Silva, E. A.; Ho, T. D.; Anderson, J. L.; Pawliszyn, J. Exploiting the tunable selectivity features of polymeric ionic liquid-based SPME sorbents in food analysis. *Talanta*, **2018**, 188, 522 – 530.

Gilart, N.; Miralles, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Fontanals, N. Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2013**, 774, 51 – 60.

González-Álvarez, J.; Blanco-Gomis, D.; Arias-Abrodo, P.; Pello-Palma, J.; Ríos-Lombardía, N.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gutiérrez-Álvarez, M. D. Analysis of beer volatiles by polymeric imidazolium-solid phase microextraction coatings: Synthesis and characterization of polymeric imidazolium ionic liquids. *J. Chromatogr. A.*, **2013**, 1305, 35 – 40.

Gracia, L. E.; Martínez, M.; Sancho, J. V.; Peñuela, G.; Hernández, F. Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2012, 99, 1011 – 1023.

Graham, C. M.; Meng, Y.; Ho, T.; Anderson, J. L. Sorbent coatings for solid-phase microextraction based on mixtures of polymeric ionic liquids. *J. Sep. Sci.* **2011**, 34, 340 – 346.

Gritti, F.; Guiochon, G. Mass transfer resistance in narrow-bore columns packed with 1.7 μm particles in very high pressure liquid chromatography. **2010**, 1217, 5069 – 5083.

Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*, 1 Edition, McGraw-Hill, USA, 2000.

Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2014**, 1357, 36 – 52.

He, Y.; Pohl, J.; Engel, R.; Rothman, L.; Thomas, M. Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine. *J. Chromatogr. A*. **2009**, 1216, 4824 – 4830.

Heringa, M. B.; Hermes, J. L. M. Measurement of free concentrations using negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME). *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 575 – 587.

Hsieh, Y. N.; Huang, P. C.; Sun, I. W.; Whang, T. J.; Hsu, C. Y.; Huang, H. H.; Kuei, C. H. Nafion membrane-supported ionic liquid-solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples. *Anal. Chim. Acta*. **2006**, 557, 321 – 328.

Ho, T. D.; Canestraro, A. J.; Anderson, J. L. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 695, 18 – 43.

Ho, T. T.; Chen, C. Y.; Li, Z. G.; Yang, T. C. C.; Lee, M. R. Determination of chlorophenols in landfill leachate using headspace sampling with ionic liquid-coated solid-phase microextraction fibers combined with gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2012**, 712, 72 – 77.

Ho, T. D.; Zhang, C.; Hantao, L. W.; Anderson, J. L. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 262 – 285.

Hosseini Banitaba, M.; Hosseini Davarani, S. S.; Pourahadi, A. Solid-phase microextraction of phthalate esters from aqueous media by electrophoretically deposited TiO₂ nanoparticles on a stainless steel fiber. *J. Chromatogr. A.* **2013**, 1283, 1 – 8.

Hou, X.; Guo, Y.; Liang, X.; Wang, X.; Wang, L.; Licheng Wang, L.; Liu, X. Bis (trifluoromethanesulfonyl) imide-based ionic liquids grafted on graphene oxide-coated solid-phase microextraction fiber for extraction and enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in potatoes and phthalate esters in food-wrap. *Talanta*, **2016**, 153, 392 - 400.

Hu, X.; Pan, J.; Hu, Y.; Li, G. Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of β -blockers in urine and plasma samples. *J. Chromatogr. A.* **2009**, 1216, 190 – 197.

Huang, K. P.; Wang, G. R.; Huang, B. Y.; Liu, C. Y. Preparation and application of ionic liquid-coated fused-silica capillary fibers for solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta.* **2009**, 645, 42 – 47.

Jeon, Y.; Sung, J.; Seo, C.; Lim, H.; Cheong, H.; Kang, M.; Moon, B.; Ouchi, Y.; Kim, D. Structures of Ionic Liquids with Different Anions Studied by Infrared Vibration Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 4735 – 4740.

Ji, J.; Liu, H.; Chen, J.; Zeng, J.; Huang, J.; Gao, L.; Wang, Y.; Chena, X. ZnO nanorod coating for solid phase microextraction and its applications for the analysis of aldehydes in instant noodle samples. *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1246, 22 – 27.

Jiménez, D. I.; Zafra, G. A.; Ballesteros, O.; Navalón, A. Analytical methods for the determination of personal care products in human samples: An overview. *Talanta.* **2014**, 129, 448 – 458.

Jouyban, A.; Soltani, S.; Shayanfar, A.; Pappa-Louisi, A. Modeling the effects of type and concentration of organic modifiers, column type and chemical structure of analytes on the retention in reversed phase liquid chromatography using a single model. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 6454 – 6463.

Käkölä, J.; Alén, R. J. A fast method for determining low-molecular-mass aliphatic carboxylic acids by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Sep. Science.* **2006**, 29: 1996 – 2003.

Kang, K.; Mao, Y.; Wang, X.; Zhang, Y.; Wu, J.; Wang, H. Disposable ionic liquid-coated etched stainless steel fiber for headspace solid-phase microextraction of organophosphorus flame retardants from water samples. *RSC Adv.* **2015**, 5, 41934 – 41940.

Kasprzyk, H. B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1293 – 1308.

Kataoka, H.; Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 339 – 364.

Kataoka, H.; Saito, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54, 926 – 950.

Lashgari, M.; Yamini, Y. An overview of the most common lab-made coating materials in solid phase microextraction. *Talanta*. **2019**, 191, 283 – 306.

Kaura, P.; Kaur, P. Time and temperature dependent adsorption-desorption behaviour of pretilachlor in soil. *Ecotox. Environ. Safe*. **2018**, 161, 145 – 155.

Le Mapihan, K.; Vial, J.; Jardy, A. Reversed-phase liquid chromatography column testing and classification: Physicochemical interpretation based on a wide set of stationary phases. *J. Chromatogr. A*. **2007**, 1144, 183 – 196.

Li, L.; Guo, R.; Li, Y.; Guo, M.; Wang, X.; Du, X. In situ growth and phenyl functionalization of titania nanoparticles coating for solid-phase microextraction of ultraviolet filters in environmental water samples followed by high performance liquid chromatography–UV detection. *Anal. Chim. Acta*. **2015**, 867, 38 – 46.

Li, Q.; Wang, X.; Yuan, D. Preparation of solid-phase microextraction fiber coated with single-walled carbon nanotubes by electrophoretic deposition and its application in extracting phenols from aqueous samples. *J. Chromatogr. A*. **2009**, 1216, 1305 – 1311.

Lin, T.; Yu, S.; Chen, W. Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China. *Chemosphere*. **2016**, 152, 1 – 9.

Liu, C.; Liao, Y.; Huang, X. Fabrication of polymeric ionic liquid-modified magnetic adsorbent for extraction of apolar and polar pollutants in complicated samples. *Talanta*, **2017**, 172, 23 – 30.

Liu, H.; Li, J.; Liu, X.; Jiang, S. A novel multiwalled carbon nanotubes bonded fused-silica fiber for solid phase microextraction–gas chromatographic analysis of phenols in water samples. *Talanta*. **2009**, 78, 929 – 935.

Liu, H.; Wang, D.; Ji, L.; Li, J.; Liu, S.; Liua, X. Jiang S. A novel TiO₂ nanotube array/Ti wire incorporated solid-phase microextraction fiber with high strength, efficiency and selectivity. *J. Chromatogr. A.* **2010**, 1217, 1898 – 1903.

Liu, J.; Li, N.; Jiang, G.; Liu, J.; Jönsson, J. A.; Wen, M. Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography–flame ionization detection. *J. Chromatogr. A.* **2005**, 1066, 27 – 32.

Liu, J. L.; Wong, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* **2013**, 59, 208 – 224.

Liu, M.; Zhou, X.; Chen, Y.; Liu, H.; Feng, X.; Qiu, G.; Liu, F.; Zeng, Z. Innovative chemically bonded ionic liquids-based sol–gel coatings as highly porous, stable and selective stationary phases for solid phase microextraction. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 683, 96 – 106.

Liu, S.; Xie, L.; Zheng, J.; Jiang, R.; Zhu, F.; Luan, T.; Ouyang, G. Mesoporous TiO₂ nanoparticles for highly sensitive solid-phase microextraction of organochlorine pesticides. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, 878, 109 – 117.

Lü, J.; Liu, J.; Wei, Y.; Jiang, K.; Fan, S.; Liu, J.; Jiang, G. Preparation of single-walled carbon nanotube fiber coating for solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in lake water and wastewater. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 2138 – 2143.

Ma, M.; Wang, H.; Zhen, Q.; Zhang, M.; Du, X. Development of nitrogen-enriched carbonaceous material coated titania nanotubes array as a fiber coating for solid-phase microextraction of ultraviolet filters in environmental water. *Talanta.* **2017**, 167, 118 – 125.

Magnusson, B.; U. Örnemark, U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd Ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

Mahdi Moein, M; El Beqqali, A.; Abdel-Rehim, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J. Chromatogr. B.* **2017**, 1043, 3 – 11.

Manchón, N.; D'Arrigo, M.; García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Martínez, J. A.; Ramos, A.; Rostagno, M. A. Comparison of different types of stationary phases for the analysis of soy isoflavones by HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 1251 – 1261.

Martín-Pozo, L.; Alarcón-Gómez, B.; Rodríguez-Gómez, R.; García-Córcoles, M .T.; Çipa, M.; Zafra-Gómez, A. *Talanta*, 2019, 192, 508 – 533.

McClellan, K.; Halden, R. U. Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water Res.* **2010**, 44, 658 – 668.

McKee, D.; Thoma, A.; Bailey, K.; Fish, J. A review of hydrofluoric acid burn management. *Plast. Surg.* **2014**, 22, 95 – 98.

Mehdinia, A.; Aziz Z., M. O. Advances for sensitive, rapid and selective extraction in different configurations of solid-phase microextraction, *TrAC.* **2013**, 51, 13 – 22.

Meng, Y.; Pino, V.; Anderson, J. L. Role of counteranions in polymeric ionic liquid-based solid-phase microextraction coatings for the selective extraction of polar compounds. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 687, 141 – 149.

Miller, J. N; Miller, J. C. *Estadística y quimiometría para la Química Analítica*; 4^a Edición, Ed. Prentice Hall Pearson Education; España, **2002**.

Naccarato, A.; Gionfriddo, E.; Sindona, G.; Tagarelli, A. Simultaneous determination of benzothiazoles, benzotriazoles and benzosulfonamides by solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in environmental aqueous matrices and human urine. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1338, 164 – 173.

Nawała, J.; Dawidziuk, B.; Dziedzic, D.; Gordon, D.; Popiel, S. Applications of ionic liquids in analytical chemistry with a particular emphasis on their use in solid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, 105, 18 – 36.

Noake, E.; Lau, D.; Nel, P. Identification of cellulose nitrate based adhesive repairs in archaeological pottery of the University of Melbourne's Middle Eastern archaeological pottery collection using portable FTIR-ATR spectroscopy and PCA. *Herit. Sci.* **2017**, 5, 1 – 15.

Oliveira, S. T.; Murphy, M.; Mendola, N.; Wong, V.; Carlson, D.; Waring, L. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci. Total Environ.* **2015**, 518 – 519, 459 – 478.

Pacheco-Fernández, I.; Najafi, A.; Pino, V.; Anderson, J.L.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M. Utilization of highly robust and selective crosslinked polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in direct-immersion solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for determining polar organic pollutants in waters. *Talanta.* **2016**, 158, 125 – 133.

Padilla-Alonso, D, A.; Garza-Tapia, M.; Chávez-Montes, A.; González-Horta, A.; Waksman de Torres, N. H.; Castro-Ríos, R. A New Temperature-Assisted Ionic Liquid- Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method for Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Water Samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2017**, 40, 147 – 155.

Paduszynski, K.; Domanska, U. Viscosity of Ionic Liquids: An Extensive Database and a New Group Contribution Model Based on a Feed-Forward Artificial Neural Network. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 1311 – 1324.

Pan, J.; Zhang, Ch.; Zhang, Z.; Li, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* **2014**, 815, 1 – 15.

Pang, L.; Yang, P.; Pang, R.; Lu, X.; Xiao, J.; Li, S.; Zhang, H.; Zhao, J. Ionogel-Based Ionic Liquid Coating for Solid-Phase Microextraction of Organophosphorus Pesticides from Wine and Juice Samples. *Food Anal. Methods*. **2018**, 11, 270 – 281.

Papageorgiou, M.; Kosma, C.; Lambropoulou, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* **2016**, 543, 547 – 569.

Paul, A.; Kumar, M. P.; Samanta, A. How transparent are the imidazolium ionic liquids? A case study with 1-methyl-3-butylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim] [PF₆]. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 402, 375 – 379.

Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction. Theory and practice; Wiley-VCH; 1a Edición, USA, **2010**.

Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Pocurull, E. Analytical methods for personal-care products in environmental waters. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 749 – 760.

Pereira, J.; Luís S., C.; Perestrelo, R.; Gonçalves, J.; Alves, V.; Câmara, J. S. Re-exploring the high-throughput potential of microextraction techniques, SPME and MEPS, as powerful strategies for medical diagnostic purposes. Innovative approaches, recent applications and future trends *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 2101 – 2122.

Petruczyński, A., Wróblewski, K., Dzioba, K. and Waksmundzka-Hajnos, M. Retention, separation selectivity and system efficiency of selected basic psychotropic drugs on different RPLC columns. *Open Chem.* **2015**, 13, 943 – 950.

Płotka, W. J.; Szczepanska, N.; De la Guardia, M.; Namiesnik, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC*, **2015**, 73, 19 – 38.

Poole, C. F.; Lenca, N. Green sample-preparation methods using room-temperature ionic liquids for the chromatographic analysis of organic compounds. *Trends Anal. Chem.* **2015**, 71, 144 – 156.

Portillo-Castillo, O. J. Evaluación del uso de líquidos iónicos en la extracción micelar de compuestos hidrofílicos. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico, **2013**.

Pub Chem. NCBI. National library of Medicine, U.S.A. (Disponibel en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulisobenzone>), consultado en Julio de 2019.

Robles, M. J.; Gilbert, L. B.; García, R. J. F.; Molina, D. A. Comparative evaluation of liquid - liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography - mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. *Talanta*. **2013**, 117, 382 – 391.

Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A. Liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 1 – 14.

Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A.; Rounaghi, G.; Eshtiagh-Hosseini, H. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by solid phase microextraction based sol–gel technique using poly (ethylene glycol) grafted multi-walled carbon nanotubes coated fiber. *Anal. Chim. Acta*. **2012**, 720, 134 – 141.

Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A.; Rounaghi, G.; Eshtiagh-Hosseini, H. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by hollow-fiber liquid membrane-protected solid-phase microextraction based on sol–gel fiber coating. *J. Chromatogr.B.* **2012**, 908, 67 – 75.

Sellergren, B.; Shea, K. J. Origin of peak solute retention asymmetry and the effect of temperatura on in enantiomer separations on imprinted chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*. **1995**, 690, 29 – 39.

Semenov, S, N.; Koziel, J. A.; Pawliszyn, J. Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *J. Chromatogr. A*. **2000**, 873, 39 – 51.

Shi, F.; Liu, J.; Liang, K.; Liu, R. Tris (pentafluoroethyl)trifluorophosphate-based ionic liquids as advantageous solid-phase micro-extraction coatings for the extraction of organophosphate esters in environmental waters. *J. Chromatogr. A.* **2016**, 1447, 9 – 16.

Sigma.<http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html>, consultada el 15 de Noviembre de **2016**.

Sing Tan, E. S; Ho, Y. B.; Zakaria, M. P.; Latif, P. A.; Saari, N. Simultaneous extraction and determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in river water and sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int. J. of Environ. Anal. Chem.* **2015**, 95, 816 – 832.

Song, D; Wang, J. Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2003**, 32, 1105 – 1112.

Song, W.; Gou, M.; Zhang, Y., Zhang, M.; Wang, X.; Du, X. Fabrication and application of zinc–zinc oxide nanosheets coating on an etched stainless Steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber. *J. Chromatogr. A.* **2015**, 1384, 28 – 36.

Souza, C. S.; Rombaldi, C.; De Oliveira, A. J. L.; Cardoso, M. L.; Gilberto, P. E. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid – liquid microextraction combined with liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Talanta.* **2016**, 146, 67 – 688.

Souza, E. A.; Jiang, R.; Rodriguez, A.; Gionfriddo, E.; Pawliszyn, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. *TrAC.* **2015**, 71, 224 – 235.

Souza, E. A.; Risticvic, S.; Pawliszyn, J. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. *TrAC.* **2013**, 43, 24 – 36.

Spietelun A.; Marcinkowski, L.; De la Guardia, M.; Namieśnik, J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*. **2014**, 119, 34 – 45.

Spietelun, A.; Kloskowski, A.; Chrzanowski, W.; Namieśnik, J. Understanding Solid-Phase Microextraction: Key Factors Influencing the Extraction Process and Trends in Improving the Technique. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 1667 – 1685.

Spietelun, A.; Pilarczyk, M.; Kloskowski, A.; Namiesnik, J. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4524 – 4537.

Stafiej, A.; Pyrzynska, K.; Regan, F. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 985 – 991.

Sun, Y.; Stalcup, A. M. Mobile phase effects on retention on a new butylimidazolium-based high-performance liquid chromatographic stationary phase. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1126, 276 – 282.

Supelco. Bulletin 938 Utility of Pentafluorophenylpropyl Stationary Phases. **2003**.
Disponibile en: www.sigma-aldrich.com/supelco-literature

Swartz, M.; Ira Krull. Analytical Method Validation: Accuracy in Quantitation. *LCGC North America*. **2015**, 23, 46 – 52.

Tanoue, R.; Nomiya, K.; Nakamura, H.; Hayashi, T.; Kim, J.; Isobe, T.; Shinohara, R.; Tanabe, S. Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1355, 193 – 205.

Taylor, T. The LCGC Blog: HPLC Diagnostic Skills–Noisy Baselines. *LCGC North America*. **2019**. <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-hplc-diagnostic-skills-noisy-baselines-1>. Consultado en Junio de 2019.

Teo, T. L.; Coleman, H. M.; Khan, S. J. Occurrence and daily variability of pharmaceuticals and personal care products in swimming pools. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, 23, 6972 – 6981.

t'Kindt, R., Storme, .M., Deforce, D. and Van Bocxlae, J. Evaluation of hydrophilic interaction chromatography *versus* reversed-phase chromatography in a plant metabolomics perspective. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1609 – 1614.

Torres, M. E.; Afonso, O. C.; Sosa F. Z.; Santana, J. J. Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples. *Molecules.* **2014**, 19, 10320 – 10349.

Trépanier, Ch. y Pelton A. R. Effect of temperature and pH of the corrosion resistance of Nitinol. *Proceedings of the International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies-2004.* **2006**, Ed. M. Mertmann, 361 – 366. Kurhaus Baden-Baden, Baden-Baden, Germany.

Truong, Q. K.; Mai, X. L.; Lee, J. Y., Rhee, J.; Vinh, D.; Hong, J.; Kim, K. H. Simultaneous determination of 14 oral antihyperglycaemic drugs in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, 41, 530 – 543.

Trujillo-Rodríguez, M. J.; Yu, H.; Cole, W. T.S.; Ho, T. D., Pino, V., Anderson, J. L.; Afonso, A. M. Polymeric ionic liquid coatings versus commercial solid-phase microextraction coatings for the determination of volatile compounds in cheeses. *Talanta.* **2014**, 121, 153 – 162.

Trujillo-Rodríguez, M. J.; Anderson, J. L. In situ generation of hydrophobic magnetic ionic liquids in stir bar dispersive liquid-liquid microextraction coupled with headspace gas chromatography. *Talanta.* **2019**, 196, 420 – 428.

UHU GmbH & Co, UHU The All Purpose Adhesive, Technical data sheet. Disponible en <http://www.uhu.ed>, consultada en Mayo de **2019**.

Vas, G.; Vékey, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass. Spectrom.* **2004**, 39, 233 – 254.

Vičkačkaitė, V.; Padarauskas, A. Ionic liquids in microextraction techniques. *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, 10, 652 – 674.

Wan Ibrahim, W. N.; Sanagi, M. M.; Mohamad Hanapi, N. S.; Kamaruzaman, S.; Yahaya, N.; Wan Ibrahim, W.A. Solid-phase microextraction based on an agarose-chitosan-multiwalled carbon nanotube composite film combined with HPLC–UV for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in aqueous samples. *J Sep Sci.* **2018**, 41, 2942 – 2951.

Wang, D.; Zhang, Z.; Luo, L.; Li, T.; Zhang, L.; Chen, G. ZnO nanorod array solid phase micro-extraction fiber coating: fabrication and extraction capability. *Nanotechnology.* **2009**, 20, 465702.

Wang, K.; Wang, J.; Hu, W. Evaluation of temperature effect on the corrosion process of 304 stainless steel in high temperature water with electrochemical noise. *Materials and design.* **2015**, 155 – 163.

Wang, Z. B.; Hu, H. X.; Zheng, Y. G.; Ke, W.; Qiao, Y. X. Comparison of the corrosion behavior of pure titanium and its alloys in fluoride-containing sulfuric acid. *Corrosion Science.* **2016**, 103, 50 – 65.

Waters. Atlantis Columns Application Notebook. **2004**; Disponible en: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000472en.pdf>

Wegmann, C.; Dekic Zivkovi, T.; Kerkhof, P. J. A. M. Solvent Selection for the Desorption of Acrylonitrile from Dowex Optipore L-493. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, 51, 474 – 479.

West, C.; Lemasson, E.; Khater, S.; Lesellier, E. An attempt to estimate ionic interactions with phenyl and pentafluorophenyl stationary phases in supercritical fluid chromatography. **2015**, 1412, 126 – 138.

Wu, J.; Pawliszyn, J. Preparation and applications of polypyrrole films in solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*. **2001**, 909, 37 – 52.

Xu, J.; Zheng, J.; Tian, J.; Zhu, F.; Zeng, F.; Su, C.; Ouyang, G. New materials in solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **2013**, 47, 68 – 83.

Yamada, T.; Tominari, Y.; Tanaka, S.; Mizuno, M. Infrared Spectroscopy of Ionic Liquids Consisting of Imidazolium Cations with Different Alkyl Chain Lengths and Various Halogen or Molecular Anions with and without a Small Amount of Water. *J. Phys. Chem. B*. **2017**, 121, 3121 – 3129.

Yang, M.; Fazio, S.; Munch, D.; Drumm, P. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π – π interactions with a reversed-phase phenyl column. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1097, 124 – 129.

Yang, Y.; Mai, W.; Gao, J.; Hu, Z.; Xu, J.; Zou, S. An in-needle solid-phase microextraction device packed with etched steel wires for polycyclic aromatic hydrocarbons enrichment in water samples. *J. Sep. Sci.* **2019**, 42, 1750 – 1756.

Yavir, K.; Marcinkowski, Ł.; Marcinkowska, R.; Namieśnik, J.; Kloskowski, A. Analytical applications and physicochemical properties of ionic liquid-based hybrid materials: A review. *Anal. Chim. Acta*. **2019**, 1 – 16.

You, L.; Nguyen, V. T.; Pal, A.; Chen, H.; He, Y.; Reinhard, M.; Yew-Hoong, G. K. Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. *Sci. Total Environ.* **2015**, 536, 955 – 963.

Zaitsev, V. N.; Zui, M. F. Preconcentration by Solid-Phase Microextraction. *J. Anal. Chem.* **2014**, 69, 715 – 727.

Zeng, J.; Chen, J.; Song, X.; Wang, Y.; Ha, J.; Chen, X.; Wang, X. An electrochemically enhanced solid-phase microextraction approach based on a multi-walled carbon nanotubes/Nafion composite coating. *J. Chromatogr. A*. **2010**, 1217, 175 – 1741.

Zenker, A.; Schmutz, H.; Karl Fent, K. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1202, 64 – 74.

Zhang, C.; Anderson, J. L. Polymeric ionic liquid bucky gels as sorbent coatings for solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*. **2014**, 1344, 15 – 22.

Zhang, H.; Du, Z.; Ji, Y.; Mei, M. Simultaneous trace determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in purified water, tap water, juice, soda and energy drink by hollow fiber-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, **2013**, 109, 177 – 184.

Zhang, X., Zhang, J.; Li, W.; Yang, Y.; Qin, P.; Zhang, X.; Lu, M. Magnetic graphene oxide nanocomposites as the adsorbent for extraction and pre-concentration of azo dyes in different food samples followed by high-performance liquid chromatography analysis. **2018**, 35, 2099 – 2110.

Zhang, Y.; Xiao Wang, X.; Lin, C.; Fang, G.; Wang, S. A Novel SPME Fiber Chemically Linked with 1-Vinyl-3-hexadecylimidazolium hexafluorophosphate Ionic Liquid Coupled with GC for the Simultaneous Determination of Pyrethroids in Vegetables. *Chromatographia*. **2012**, 75, 789 – 797.

Zhang, Y.; Kee Lee, H. Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta*. **2012**, 750, 120 – 126.

Zhao, G.; Song, S.; Wang, C.; Wu, Q.; Wang, Z. Solid-phase microextraction with a novel graphene-coated fiber coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of some carbamates in water samples. *Anal. Methods*. **2011**, 3, 2929 – 2935.

Zhen, Q.; Zhang, M.; Song, W.; Wang, H.; Wang, X.; Du, X. Rapid in situ growth of oriented titanium-nickel oxide composite nanotubes arrays coated on a nitinol wire as a solid phase microextraction fiber coupled to HPLC – UV. *J. Sep. Sci.* **2016**, 39, 3761 – 3768.

Zheng, J.; Huang, J.; Yang, Q.; Ni, C.; Xie, X.; Shi, Y.; Sun, J.; Zhu, F.; Ouyang, G. Fabrications of novel solid phase microextraction fiber coatings based on new materials for high enrichment capability. *Trends in Analytical Chemistry*, **2018**, 108, 135 – 153.

Zhou, X.; Shao, X.; Shu, J.; Liu, M.; Liu, H.; Feng, X; Liu, F. Thermally stable ionic liquid-based sol–gel coating for ultrasonic extraction–solid-phase microextraction–gas chromatography determination of phthalate esters in agricultural plastic films. *Talanta*. **2012**, 89, 129 – 135.

CAPÍTULO 10

ANEXOS

10.1 Cromatogramas obtenidos en la columna Atlantis dC18

En las siguientes figuras, se muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos bajo las condiciones probadas en la columna Atlantis dC18; para la separación de los ocho PPCPs incluidos en el estudio.

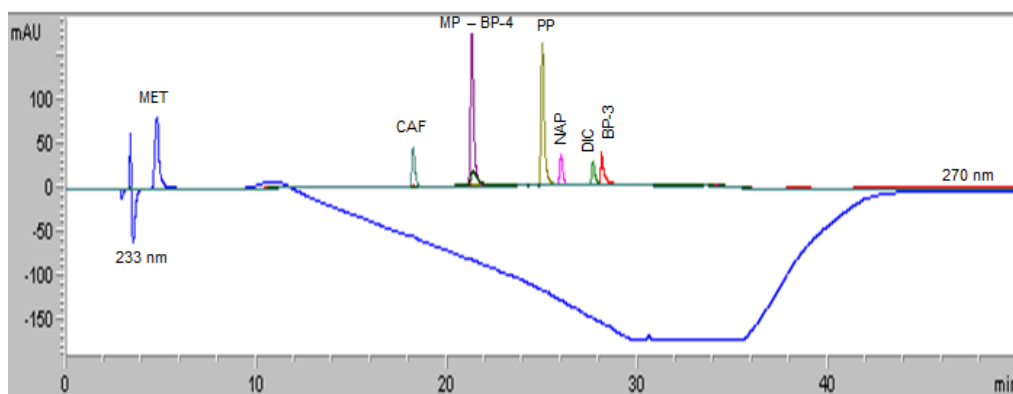


Figura 1A. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Atlantis dC_{18} , flujo de 0.15 mL min^{-1} , 40°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 99% A y 1% B, en 20 min cambia a 10% A y 90% B permaneciendo 5 min, luego en 5 min llega a 99% A y 1% B, permaneciendo sin cambio 20 min.

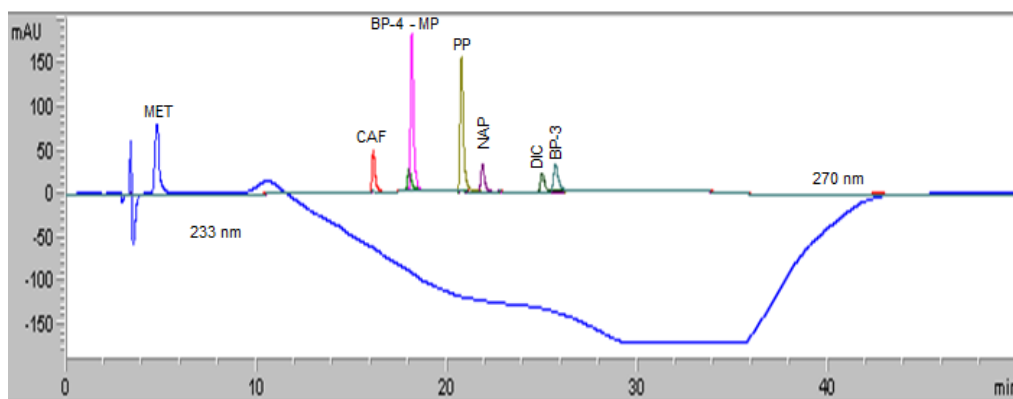


Figura 1B. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Atlantis dC_{18} , flujo de 0.15 mL min^{-1} , 40°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 99 %A y 1% B, en 10 min cambia a 30% A y 70% B permaneciendo 5 min, luego en 5 min llega a 10% A y 90% B, permaneciendo sin cambio 5 min, luego regresar a 99% A y 1% B en 5 min y permaneciendo sin cambio 20 min.

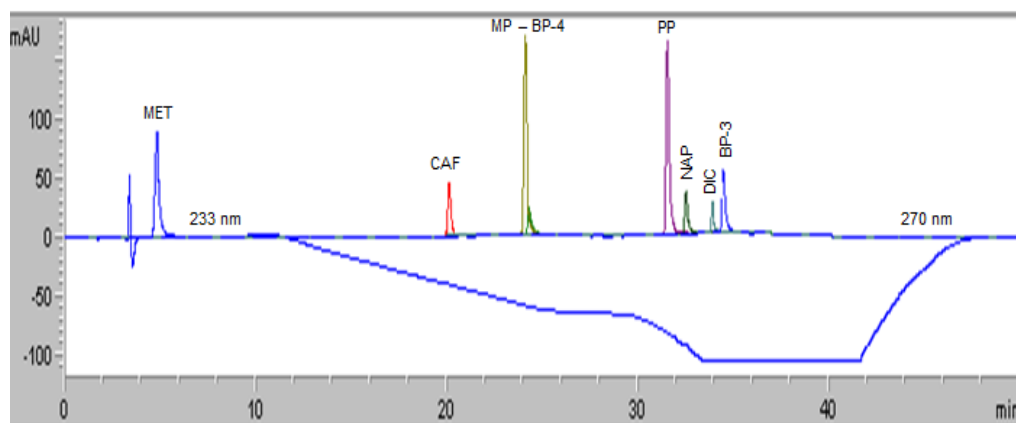


Figura 1C. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Atlantis dC_{18} , flujo de 0.15 mL min^{-1} , 40°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 99% A y 1% B, en 15 min cambia a 50% A y 50% B permaneciendo 5 min, luego en 5 min llega a 10% A y 90% B, permaneciendo sin cambio 5 min, luego regresar a 99% A y 1% B en 5 min y permaneciendo sin cambio 15 min.

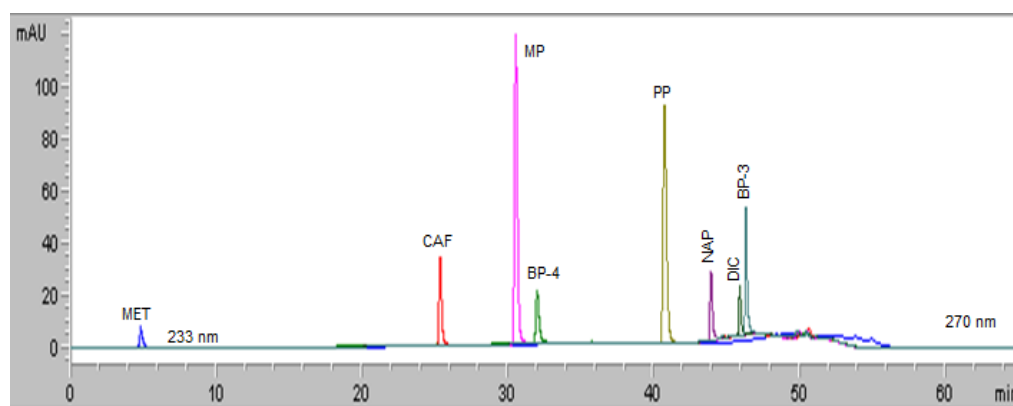


Figura 1D. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Atlantis dC_{18} , flujo de 0.2 mL min^{-1} , 40°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 99% A y 1% B permaneciendo 5 min, en 25 min cambia a 50% A y 50% B permaneciendo 5 min, luego en 5 min llega a 10% A y 90% B, permaneciendo sin cambio 5 min, luego regresar a 99% A y 1% B en 5 min y permaneciendo sin cambio 15 min.

10.2 Cromatogramas obtenidos en la columna Discovery HSF5

En las siguientes figuras, se muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos con las condiciones probadas en la columna Dsiccovery HSF5; para la separación de los ocho PPCPs incluidos en el estudio.

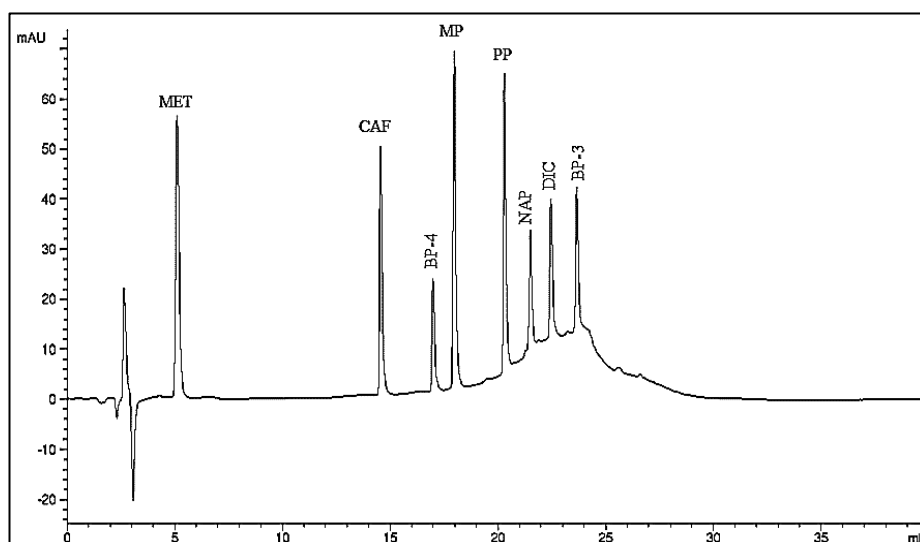


Figura 2A. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM (pH4) y metanol, utilizando el gradiente: 95% A y 5% B, en 15 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 5 min, luego en 5 min cambia a 95% A y 5% B permaneciendo sin cambio 15 min.

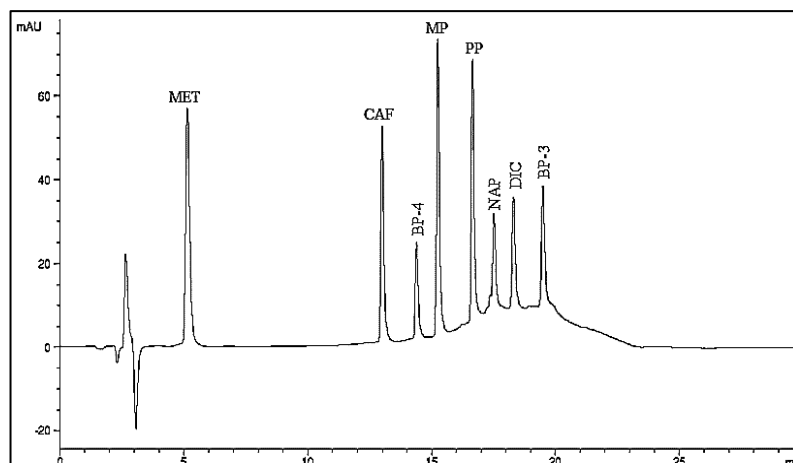


Figura 2B. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 95% A y 5% B, en 10 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 5 min, luego en 2 min cambia a 95% A y 5% B permaneciendo sin cambio 13 min.

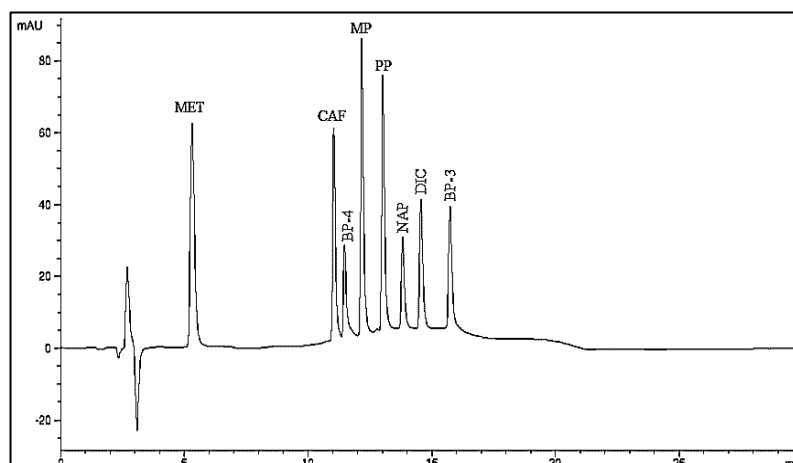


Figura 2C. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 95% A y 5% B, en 5 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 8 min, luego en 2 min cambia a 95% A y 5% B permaneciendo sin cambio 15 min.

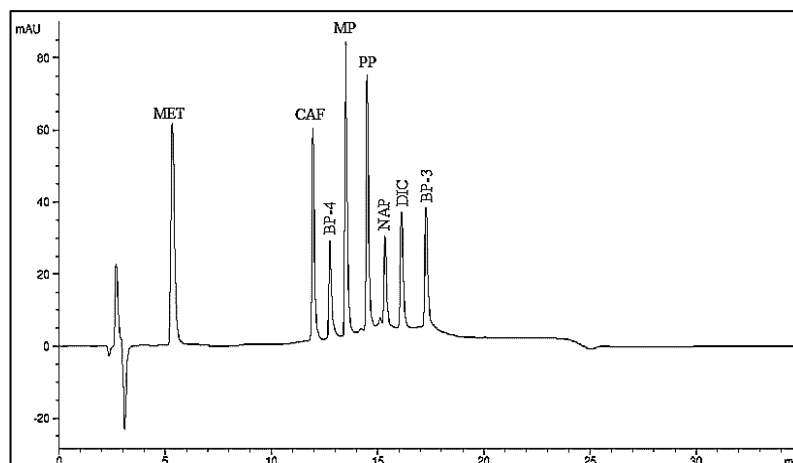


Figura 2D. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 95% A y 5% B, en 7 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 10 min, luego en 1 min cambia a 95% A y 5% B permaneciendo sin cambio 17 min.

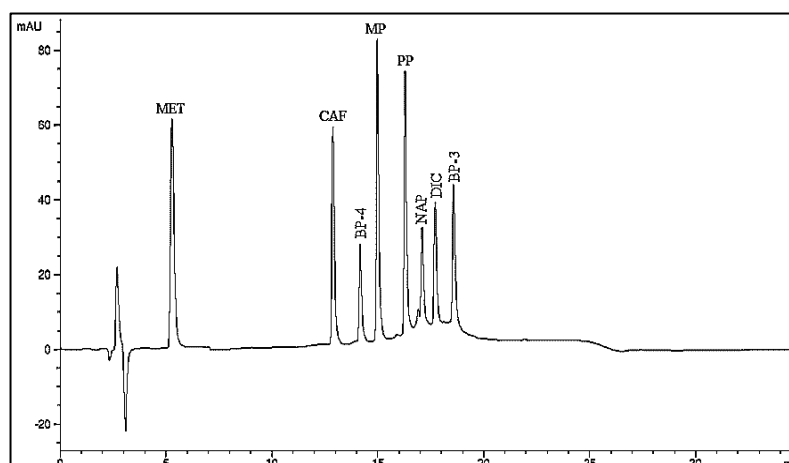


Figura 2E. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo HP 1100. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 95% A y 5% B, en 10 min cambia a 10% A y 90% B permaneciendo 8 min, luego en 2 min cambia a 95% A y 5% B permaneciendo sin cambio 15 min.

En las siguientes figuras, se muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos con las condiciones probadas en la columna Dsiccovery HSF5 para la separación de los cinco PPCPs extraídos.

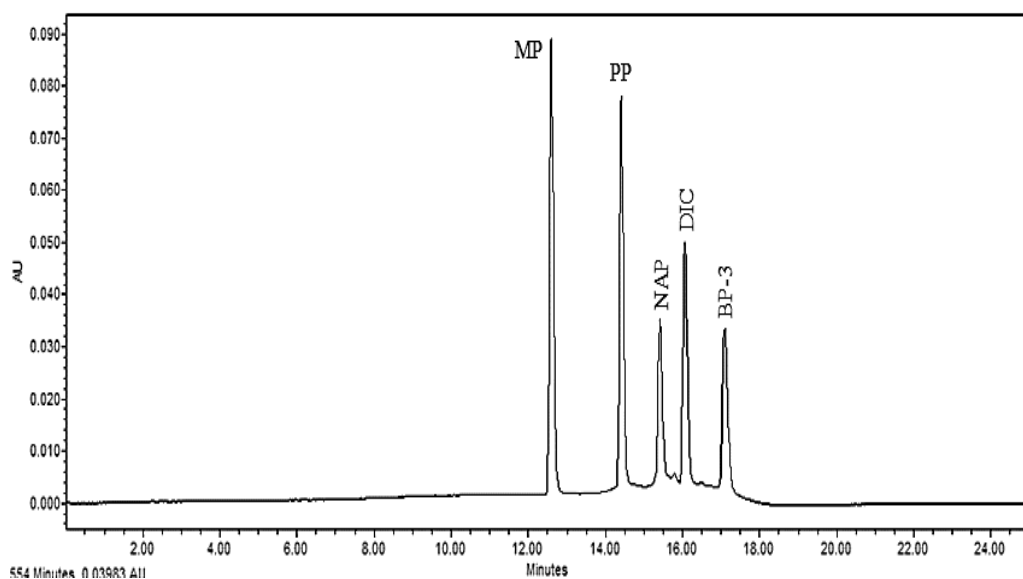


Figura 2F. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo Waters 2695. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM (pH4) y metanol, utilizando el gradiente: 80% A y 20% B permaneciendo 1 min, luego en 8 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 2 min, luego en 1 min cambia a 80% A y 20% B permaneciendo sin cambio 13 min.

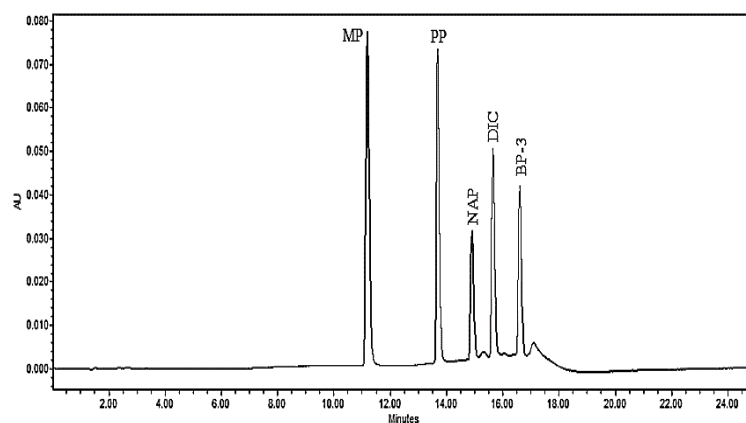


Figura 2G. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo Waters 2695. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 70% A y 30% B permaneciendo 1 min, luego en 8 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 2 min, luego en 1 min cambia a 70% A y 30% B permaneciendo sin cambio 13 min.

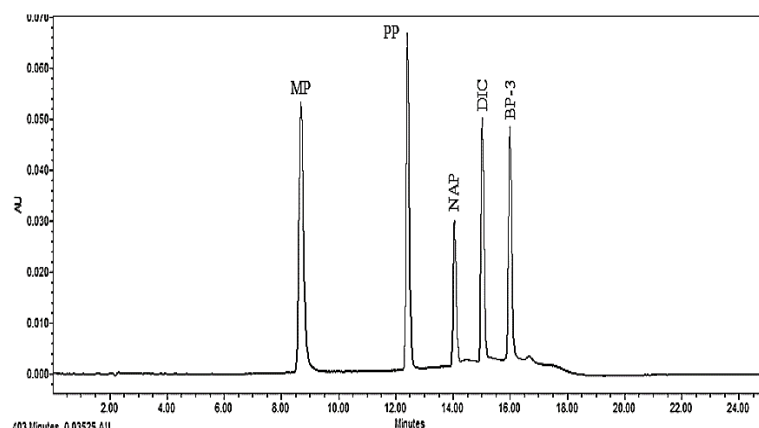


Figura 2H. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo Waters 2695. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 60% A y 40% B permaneciendo 1 min, luego en 8 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 2 min, luego en 1 min cambia a 60% A y 40% B permaneciendo sin cambio 13 min.

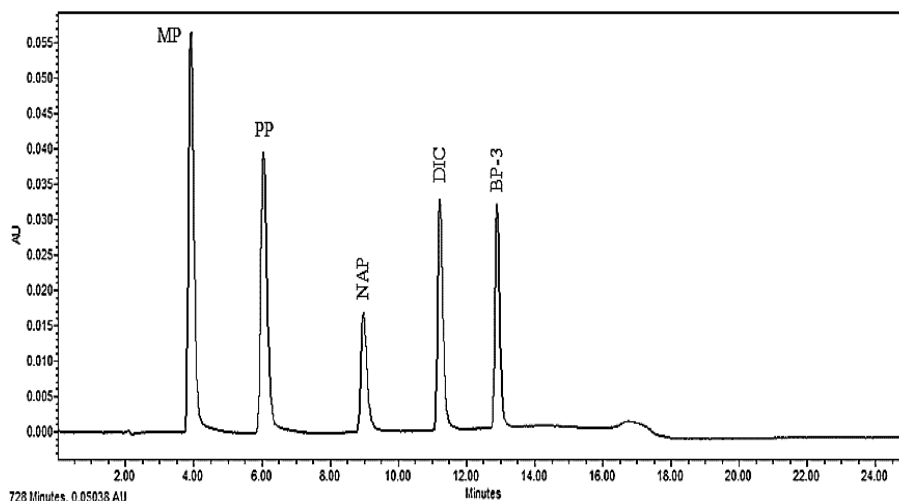


Figura 2I. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo Waters 2695. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 45°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 40% A y 60% B permaneciendo 1 min, luego en 8 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 2 min, luego en 1 min cambia a 40% A y 60% B permaneciendo sin cambio 13 min.

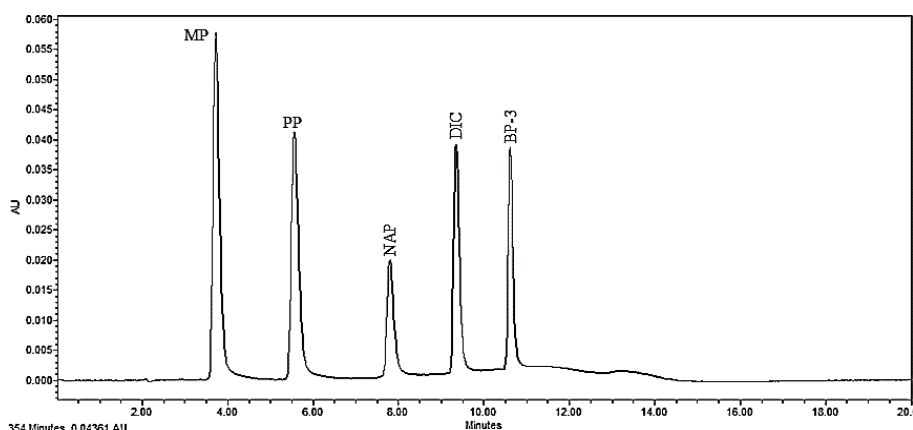


Figura 2J. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo Waters 2695. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.2 mL min^{-1} , 50°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 40% A y 60% B, luego en 5 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 2 min, luego en 2 min cambia a 40% A y 60% B permaneciendo sin cambio 11 min.

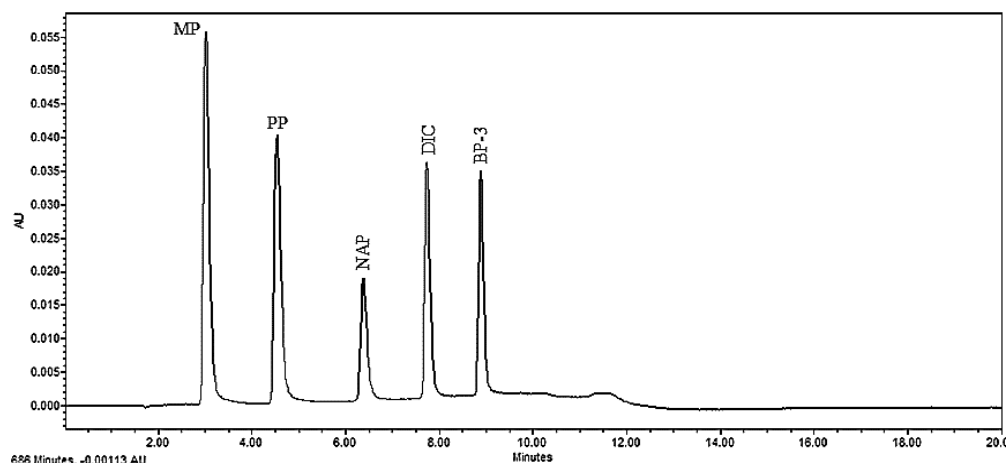


Figura 2K. Cromatograma obtenido para una mezcla de PPCPs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cromatógrafo Waters 2695. Columna Discovery HSF5, flujo de 0.25 mL min^{-1} , 50°C . Fase móvil: buffer de formiatos 40 mM ($\text{pH}4$) y metanol, utilizando el gradiente: 40% A y 60% B, luego en 5 min cambia a 15% A y 85% B permaneciendo 2 min, luego en 2 min cambia a 40% A y 60% B permaneciendo sin cambio 11 min.